



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)



---

**Présentée et soutenue par :**

**Marion MILLER**

**le** 26 Novembre 2015

**Titre :**

Caractérisation du rôle et du mode d'action de MLF  
au cours de l'hématopoïèse  
chez la Drosophile

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Biologie du développement

**Unité de recherche :**

Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR 5547

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. Lucas WALTZER

Dr. Marc HAENLIN

**Jury :**

Pr. David CRIBBS, président

Dr. Carmen GARRIDO, rapportrice

Dr. Marie-Odile FAUVARQUE, rapportrice

Dr. Frédérique PERONNET, rapportrice

Dr. Lucas WALTZER, directeur de thèse

Dr. Marc HAENLIN, directeur de thèse

## **Sommaire**

Résumé.....	1
Abstract.....	3
Préambule.....	5
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b><u>I. L'hématopoïèse : un processus conservé de la Drosophile à l'Homme.....</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b>I.A. Les différents types de cellules sanguines et leurs fonctions.....</b>	<b>8</b>
I.A.1. Les cellules sanguines chez les mammifères.....	8
I.A.2. Les cellules sanguines chez la Drosophile.....	10
I.A.2.a. Les progéniteurs hématopoïétiques ou prohémodocytes.....	11
I.A.2.b. Les plasmotocytes.....	12
I.A.2.b.i. Description.....	12
I.A.2.b.ii. Rôles des plasmotocytes au cours du développement.....	13
I.A.2.b.iii. Rôles des plasmotocytes au cours de l'immunité cellulaire.....	13
I.A.2.b.iiii. Rôles des plasmotocytes au cours de l'immunité humorale.....	14
I.A.2.c. Les cellules à cristaux.....	14
I.A.2.d. Les lamellocytes.....	15
<b>I.B. Processus de formation des cellules hématopoïétiques.....</b>	<b>17</b>
I.B.1. Chez les mammifères.....	17
I.B.2. Chez la Drosophile.....	18
I.B.2.a. Dans l'embryon de Drosophile.....	18
I.B.2.b. Chez la larve de Drosophile.....	19
I.B.2.b.i. Les hémocytes circulants et résidents.....	19
I.B.2.b.ii. La glande lymphatique.....	20
I.B.2.c. Chez la Drosophile adulte.....	21
<b>I.C. Le contrôle moléculaire de l'hématopoïèse.....</b>	<b>22</b>
I.C.1. Contrôle moléculaire de l'hématopoïèse chez l'embryon de Drosophile.....	22

I.C.1.a	Spécification et différenciation des hémocytes embryonnaires.....	22
I.C.1.b.	Les précurseurs de la glande lymphatique.....	24
I.C.2.	Contrôle moléculaire de l'hématopoïèse larvaire chez la Drosophile....	25
I.C.2.a.	Contrôle du maintien du caractère indifférencié des prohémostocytes.....	25
I.C.2.a.i.	Maintien autonome des prohémostocytes de la zone médullaire.....	26
I.C.2.a.ii.	Signaux issus des cellules du PSC.....	27
I.C.2.a.iii.	Signaux issus des cellules différenciées de la zone corticale.....	27
I.C.2.a.iiii.	Signaux systémiques.....	28
I.C.2.a.v.	Le cas des progéniteurs circulants.....	28
I.C.2.b.	Contrôle moléculaire de la spécification des cellules à cristaux.....	29
I.C.2.c.	Contrôle moléculaire de la spécification des plasmotocytes....	31
I.C.2.d.	Contrôle moléculaire de la spécification des lamellocytes.....	32
<b>II.</b>	<b>Les facteurs de transcription de la famille RUNX et l'hématopoïèse.....</b>	<b>34</b>
<b>II.A.</b>	<b>Les leucémies et l'identification de RUNX1.....</b>	<b>34</b>
<b>II.B.</b>	<b>La famille RUNX : Description.....</b>	<b>35</b>
II.B.1.	La famille RUNX chez les mammifères.....	35
II.B.2.	La famille RUNX chez la Drosophile.....	36
<b>II.C.</b>	<b>Les facteurs RUNX au cours de l'hématopoïèse.....</b>	<b>37</b>
II.C.1.	Rôle des facteurs de type RUNX au cours de l'hématopoïèse .....	37
II.C.1.a.	Rôles de RUNX1 chez les mammifères.....	37
II.C.1.b.	Rôle de LZ chez la Drosophile.....	38
II.C.2.	Mode d'action des facteurs de type RUNX au cours de l'hématopoïèse.....	38
II.C.2.a.	Mode d'action de RUNX1 chez les mammifères.....	38
II.C.2.b.	Mode d'action de LZ chez la Drosophile.....	39
<b>II.D.</b>	<b>Régulations post-traductionnelles de l'activité des facteurs de type RUNX.....</b>	<b>39</b>
<b>II.E.</b>	<b>Facteurs RUNX et pathologies.....</b>	<b>41</b>

II.E.1. RUNX et pathologies chez l'homme.....	41
II.E.2. La Drosophile comme modèle pour l'étude de RUNX1-ETO.....	43
<b>III. Les facteurs Myeloid Leukemia Factor, MLF.....</b>	<b>45</b>
<b>III.A. La famille MLF : Une famille conservée au cours de l'évolution.....</b>	<b>45</b>
III.A.1. La famille MLF chez les mammifères.....	45
III.A.2. MLF chez la Drosophile.....	45
<b>III.B. Rôle des membres de la famille MLF dans l'hématopoïèse et la leucémogénèse.....</b>	<b>46</b>
III.B.1. hMLF1 dans le développement des MDS et des LAM.....	46
III.B.2. MLF1 et l'hématopoïèse chez les mammifères.....	47
III.B.3. MLF et l'hématopoïèse chez la Drosophile.....	48
III.B.4. Conservation de MLF entre la Drosophile et l'Homme.....	49
<b>III.C. Autres fonctions des protéines MLF.....</b>	<b>50</b>
III.C.1. MLF et suppression de la toxicité induite par les protéines à poly-glutamines.....	50
III.C.2. MLF et cycle cellulaire.....	51
III.C.2.a. Chez les mammifères.....	51
III.D.1.b. Chez la Drosophile.....	52
III.C.3. Fonctions de MLF2.....	53
<b>IV. Les chaperons de la famille DnaJ/Hsp40 .....</b>	<b>54</b>
<b>IV.A Généralités sur les chaperons.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.B Les protéines de choc thermique.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.C. Les protéines de la famille DnaJ : Description.....</b>	<b>55</b>
IV.C.1. Le couple Hsp70-DnaJ.....	56
IV.C.2 Structure et classification des protéines de la famille DnaJ.....	56
<b>IV.D. Les chaperons Hsp70/DnaJ et l'hématopoïèse.....</b>	<b>57</b>
<b>IV.E Les chaperons dans le développement de pathologies.....</b>	<b>58</b>
<b>IV. Objectifs de mon travail de thèse.....</b>	<b>60</b>

<b>RESULTATS.....</b>	<b>61</b>
<b><u>Partie I : Caractérisation du rôle et du mode d'action de MLF au cours de l'hématopoïèse chez la larve de Drosophile.....</u></b>	<b><u>62</u></b>
<b>I.A.Introduction.....</b>	<b>62</b>
<b>I.B. Résultats.....</b>	<b>63</b>
I.B.1. Caractérisation du rôle de MLF dans la glande lymphatique.....	63
I.B.2. Caractérisation du rôle et du mode d'action de MLF dans les cellules circulantes chez la larve.....	64
I.B.2.a. MLF contrôle le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes en régulant positivement le niveau de LZ.....	64
I.B.2.b. MLF contrôle la signalisation Notch dans les cellules à cristaux.....	66
I.B.2.c Caractérisation de la fonction de MLF dans les cellules à cristaux circulantes chez la larve : approche transcriptomique.....	67
 <b>Partie II : Etude du mode d'action de MLF et identification de ses partenaires en culture de cellules.....</b>	 <b>69</b>
<b>II.A. Introduction.....</b>	<b>69</b>
<b>II.B. Résultats.....</b>	<b>69</b>
II.B.1. Mode d'action de MLF.....	69
II.B.1.a. MLF régule post-traductionnellement le niveau de LZ.....	69
II.B.1.b. MLF et LZ interagissent physiquement.....	71
II.B.1.c. Mode d'action de MLF : analyse candidat.....	71
II.B.2. DNAJ1 : un partenaire de MLF qui régule le niveau de LZ .....	72
II.B.2.a. Identification des partenaires de MLF par spectrométrie de masse.....	72
II.B.2.b. DNAJ1 interagit physiquement avec MLF et LZ.....	73
II.B.2.c. DNAJ1 régule post-transcriptionnellement l'activité et le niveau de LZ.....	74
II.B.3. Le chaperon HSC70-4 interagit avec LZ et régule son niveau d'expression.....	75
II.B.3.a. HSC70-4 interagit avec DNAJ-1, MLF et LZ.....	75
II.B.3.b. HSC70-4 régule post-transcriptionnellement le niveau d'expression de LZ.....	76

<b>Partie III : Caractérisation du rôle de DNAJ1 au cours du développement des cellules à cristaux circulantes chez la larve.....</b>	<b>77</b>
<b>III.A. Introduction.....</b>	<b>77</b>
<b>III.B. Résultats.....</b>	<b>77</b>
III.B.1. Etablissement d'une lignée de Drosophiles mutantes pour DnaJ1.....	78
III.B.2. Rôle de DNAJ1 au cours de l'hématopoïèse larvaire.....	79
III.B.2.a. DNAJ1 contrôle le nombre et la taille des cellules à cristaux circulantes.....	79
III.B.2.b. <i>DnaJ1</i> interagit génétiquement avec <i>mlf</i> au cours du développement des cellules à cristaux circulantes.....	80
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>82</b>
<b><u>I. Synthèse des résultats.....</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>II. Discussion et perspectives.....</u></b>	<b><u>83</u></b>
II.A. Le complexe MLF/DNAJ1/HSC70-4 et LZ.....	83
II.B. Fonction moléculaire de MLF : un (co)chaperon ?.....	84
II.C. MLF et contrôle du niveau de LZ.....	85
II.D. DNAJ1 et le contrôle de LZ <i>in vivo</i> .....	86
II.E. Mécanismes de régulation du nombre et de la taille des cellules à cristaux par MLF et LZ.....	87
II.E.1. La voie JNK.....	88
II.E.2. La prolifération et l'apoptose.....	88
II.E.3. La voie Notch.....	89
II.F. MLF : un régulateur clé de l'expression génique dans les cellules à cristaux.....	90
II.G. Fonctions de DNAJ1 <i>in vivo</i> : un régulateur de l'hématopoïèse et plus ? ...	91
II.H. Conservation.....	92
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>100</b>

## Résumé

L'hématopoïèse est le processus développemental qui permet la formation des cellules qui composent le sang. Au niveau moléculaire, de nombreux facteurs de transcription permettent une régulation fine de ce processus et la dérégulation de leur activité, en affectant la différenciation ou la prolifération des cellules sanguines, peut conduire à l'apparition d'hémopathies telles que les leucémies. De manière intéressante, de nombreux gènes contrôlant l'hématopoïèse sont conservés entre la *Drosophile* et l'homme. Ces dernières années, cet insecte a donc émergé en tant que modèle pour l'étude du développement normal et pathologique des cellules hématopoïétiques.

En tirant profit de cette conservation, mon travail de thèse a visé à caractériser, chez la *Drosophile*, le rôle et le mode d'action des protéines de la famille « Myeloid Leukemia Factor » (MLF). En effet, bien que le membre fondateur de cette famille soit impliqué dans le développement de Leucémies Aigües Myéloïdes chez l'homme, ces protéines restent très peu caractérisées. Les travaux réalisés dans l'équipe montrent que MLF contrôle l'homéostasie du système sanguin de la *Drosophile*, et qu'un aspect conservé de la fonction des protéines MLF est de réguler l'activité de facteurs de transcription de type RUNX dont Lozenge (LZ). Dans ce contexte, j'ai cherché à déterminer plus précisément la fonction de MLF dans l'hématopoïèse et à comprendre comment MLF régule les facteurs RUNX.

*In vivo*, j'ai montré que MLF contrôle non seulement le nombre de cellules sanguines RUNX+/LZ+ mais aussi leur différenciation en "cellules à cristaux". L'établissement par RNAseq du transcriptome de ces cellules en contexte sauvage ou mutant pour *mlf* m'a permis d'identifier de nouveaux marqueurs de ce lignage et de montrer que *mlf* régule l'expression de nombre d'entre eux. De plus j'ai mis en évidence que ces deux aspects de la fonction de *mlf* passent par la régulation de LZ. Ainsi, bien que *lz* soit nécessaire au développement des cellules à cristaux, une diminution de son expression s'accompagne d'une augmentation du nombre de ces cellules qui présentent alors des caractéristiques « hyper-différenciées » et une sur-activation de la voie de signalisation Notch. Ces données mettent en exergue l'importance de la régulation du niveau du facteur RUNX LZ par MLF au cours de l'hématopoïèse.

D'autre part, en utilisant une lignée de cellules sanguines de *Drosophile* en culture (cellules Kc167), j'ai pu montrer que MLF régule post-traductionnellement le niveau de LZ et que MLF et LZ interagissent physiquement. Pour ouvrir de nouvelles pistes quant aux mécanismes moléculaires d'action de MLF, j'ai également cherché ses partenaires par

spectrométrie de masse. J'ai ainsi identifié la protéine chaperonne DNAJ1/HSP40 et j'ai pu mettre en évidence que ce partenaire de MLF est aussi impliqué dans la régulation de l'activité et du niveau d'expression de LZ en culture cellulaire. J'ai ensuite généré un mutant de ce gène chez la Drosophile par CRISPR et j'ai pu montrer qu'il contrôle lui aussi le développement des cellules sanguines LZ+, probablement en interaction avec MLF. Mes résultats suggèrent donc que MLF pourrait faire partie d'un complexe chaperon impliqué dans le contrôle de l'activité de LZ et dans l'hématopoïèse.



## **Abstract**

Haematopoiesis is the developmental process responsible for the formation of all blood cell types. At the molecular level, many transcription factors allow tight regulation of this process and deregulation of their activity, by affecting blood cell proliferation or differentiation, can lead to the appearance of various diseases including leukaemia. Interestingly, many genes implicated in haematopoiesis are conserved between *Drosophila* and human. Consequently, this insect has emerged as a potent model to study normal and pathological blood cell development.

Taking advantage of this conservation, my thesis aimed at characterizing the role and mode of action of the "Myeloid Leukemia Factor" (MLF) family in *Drosophila*. Indeed, although the founding member of this family is involved in the development of Acute Myeloid Leukaemia in humans, this family remains poorly characterized. Previous work showed that MLF controls *Drosophila* blood cell homeostasis and that one conserved aspect of MLF function is to regulate the activity of RUNX transcription factor activity, including that of the *Drosophila* hematopoietic factor LOZENGE (LZ). Further to these results, I sought to determine more precisely MLF function in haematopoiesis and its molecular mechanism of action on RUNX factors.

In vivo, I showed that *mlf* controls not only the number of LZ + blood cells but also their differentiation into "crystal cells. Notably, the establishment of wild type or *mlf*<sup>-/-</sup> LZ+ cells transcriptome by RNAseq allowed me to identify new markers for this lineage and revealed that *mlf* regulates the expression of a large number of them. Interestingly, I found that *mlf* controls both LZ+ cell number and their differentiation by regulating LZ level. Indeed, although *lz* is required for crystal cell development, a decrease in *lz* level is associated with increased LZ+ cell number and these cells exhibit "hyper-differentiated" phenotypes as well as Notch signaling pathway over-activation. These data underline the crucial role of RUNX level regulation by MLF for normal blood cell development.

In parallel, using a *Drosophila* blood cell line (Kc167 cells), I showed that MLF physically interacts with LZ and post-translationally regulates its level. To open new leads concerning the molecular mode of action of MLF, I undertook a proteomic approach to identify its partners. Thereby, I found that the chaperon protein DNAJ1/HSP40 binds to MLF and I demonstrated that DNAJ1 is also implicated in the regulation of LZ level and activity in

Kc cells. Using a CRISPR approach, I then generated a null *dnaj1* allele in *Drosophila* and its phenotypic characterization allowed me to show that DNAJ1 also controls the development of LZ+ blood cells, probably in interaction with MLF. All together, my results suggest that MLF could be part of a « chaperon » complex involved in controlling RUNX activity and haematopoiesis.

## **Préambule**

L'hématopoïèse est le processus développemental qui permet la formation ainsi que le renouvellement continu des différentes cellules qui composent le sang, sachant que dans l'organisme humain adulte environ  $10^{13}$  cellules hématopoïétiques sont produites chaque jour. Au niveau moléculaire, de nombreux facteurs de transcription permettent une régulation fine de ce processus et la dérégulation de l'activité de ces facteurs, en affectant la différenciation ou la prolifération des cellules sanguines, peut conduire à l'apparition de diverses pathologies dont les leucémies. Au cours de ma thèse je me suis intéressée aux protéines de la famille « Myeloid Leukemia Factor » (MLF). En effet, bien que le membre fondateur de cette famille soit impliqué dans le développement de Leucémies Aigües Myéloïdes (LAM) chez l'homme, les fonctions et mécanismes d'action de ces protéines restent très peu caractérisés. Les travaux réalisés dans l'équipe montrent que MLF est requis pour le développement normal d'un des trois types de cellules sanguines décrites chez la Drosophile, les cellules RUNX+, et qu'un aspect conservé de la fonction des protéines MLF est de réguler l'activité des facteurs de transcription de type RUNX.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour objectif de déterminer comment MLF régule le développement des cellules sanguines et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires par lesquels MLF régule l'activité des facteurs de type RUNX en utilisant la Drosophile comme modèle.

Afin de caractériser le rôle de MLF dans le développement des cellules sanguines chez la Drosophile j'ai d'une part poursuivi la caractérisation des phénotypes hématopoïétiques associés à la perte de *mlf in vivo* et d'autre part établi le transcriptome des cellules RUNX+ dans un contexte sauvage ou mutant pour *mlf*. Mes résultats montrent que *mlf* contrôle l'expression de nombreux marqueurs de différenciation des cellules RUNX+ ainsi que de cibles de la voie Notch, voie qui participe à l'acquisition des caractères morphologiques de ces cellules. En parallèle, j'ai recherché les protéines s'associant à MLF dans une lignée cellulaire de Drosophile et ainsi identifié la protéine chaperon DNAJ1/HSP40 en tant que partenaire de MLF également impliqué dans la régulation de l'activité d'un facteur de type RUNX en culture cellulaire ainsi que dans le développement des cellules sanguines RUNX+ *in vivo* chez la Drosophile.

Dans le premier chapitre de cette introduction je décrirai donc le processus hématopoïétique chez la *Drosophile* et les mammifères. Dans ce contexte, je me suis intéressée à la caractérisation des protéines de la famille MLF et à leur mode de régulation de l'activité des facteurs RUNX qui sont des acteurs clés de l'hématopoïèse également impliqués dans la leucémogenèse. Je décrirai donc dans un second chapitre les facteurs de transcription de la famille RUNX, leurs fonctions au cours de l'hématopoïèse ainsi que les mécanismes mis en œuvre pour réguler leur l'activité. Dans un troisième chapitre je décrirai les facteurs de la famille MLF, leur structure ainsi que leurs fonctions. Enfin, dans un dernier chapitre, ayant identifiée le chaperon DNAJ1 comme partenaire fonctionnel de MLF, je décrirai les protéines de la famille DNAJ1/HSP40 ainsi que leurs fonctions au cours de l'hématopoïèse.

# ***INTRODUCTION***

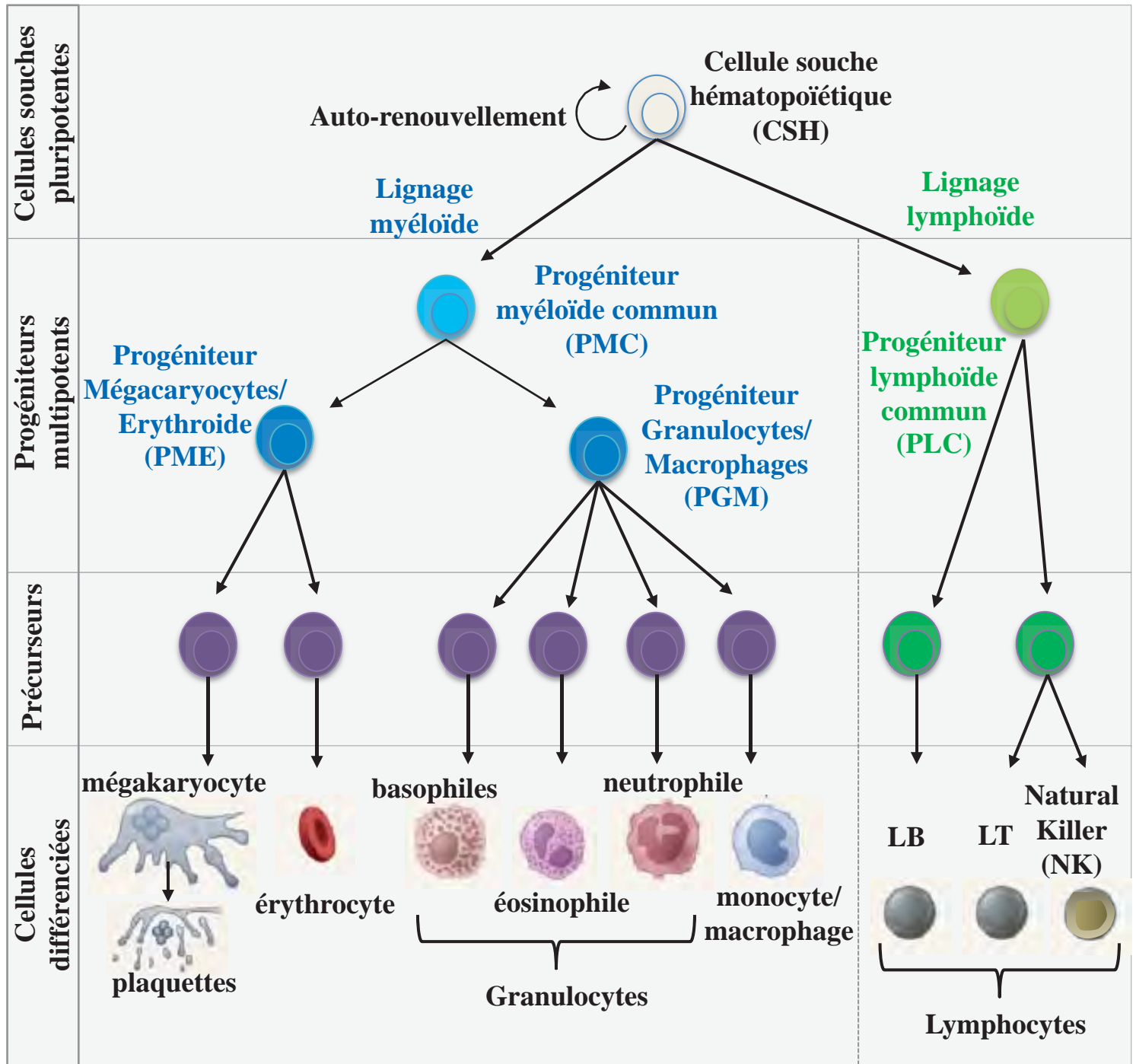
## **I. L'hématopoïèse : un processus conservé de la Drosophile à l'Homme**

L'hématopoïèse est le processus permettant la production des différents types de cellules qui composent le sang. Ces cellules sanguines sont formées à partir de précurseurs pluripotents qui vont proliférer puis se différencier en cellules spécialisées. Alors que chez les vertébrés de nombreux types cellulaires sanguins coexistent, chez *Drosophila melanogaster*, il existe seulement trois types de cellules sanguines matures qui sont apparentées aux cellules myéloïdes des mammifères : les plasmacytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes. Au niveau moléculaire, de nombreux facteurs de transcription et voies de signalisation contrôlent le processus hématopoïétique et la dérégulation de l'activité de ces facteurs, en affectant la différenciation ou la prolifération des cellules sanguines, peut conduire à l'apparition de nombreuses pathologies dont les leucémies. De manière intéressante, les réseaux génétiques responsables du contrôle de l'hématopoïèse présentent un degré important de conservation entre la Drosophile et l'Homme. Notamment, des facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules sanguines chez la Drosophile sont également impliqués dans ce processus chez l'Homme. Les outils génétiques disponibles chez la Drosophile, la simplicité de son système hématopoïétique et la conservation des facteurs contrôlant l'hématopoïèse entre l'Homme et la Drosophile ont largement contribué à faire de cet insecte un modèle de choix pour étudier l'hématopoïèse et le développement des leucémies.

Dans ce chapitre, je décrirai dans un premier temps les différents lignages hématopoïétiques et leur fonction chez les mammifères puis chez la Drosophile. Je détaillerai ensuite les processus de formation de ces cellules sanguines avant de terminer par décrire les acteurs moléculaires contrôlant l'hématopoïèse ainsi que leurs liens avec le développement d'hémopathies malignes.

### **I.A. Les différents types de cellules sanguines et leurs fonctions**

#### **I.A.1. Les cellules sanguines chez les mammifères**



**Figure 1 : Représentation schématique des différents lignages hématopoïétiques et de leur formation chez les mammifères.**

Chez les mammifères, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de l'ensemble des cellules hématopoïétiques. Ces cellules vont subir des étapes successives de différenciation : les CSH vont dans un premier temps générer deux types de progéniteurs distincts : les progéniteurs myéloïdes (CMP) et les progéniteurs lymphoïdes (CLP) qui vont dans un second temps être à l'origine respectivement de l'ensemble des cellules du lignage myéloïde et du lignage lymphoïde.

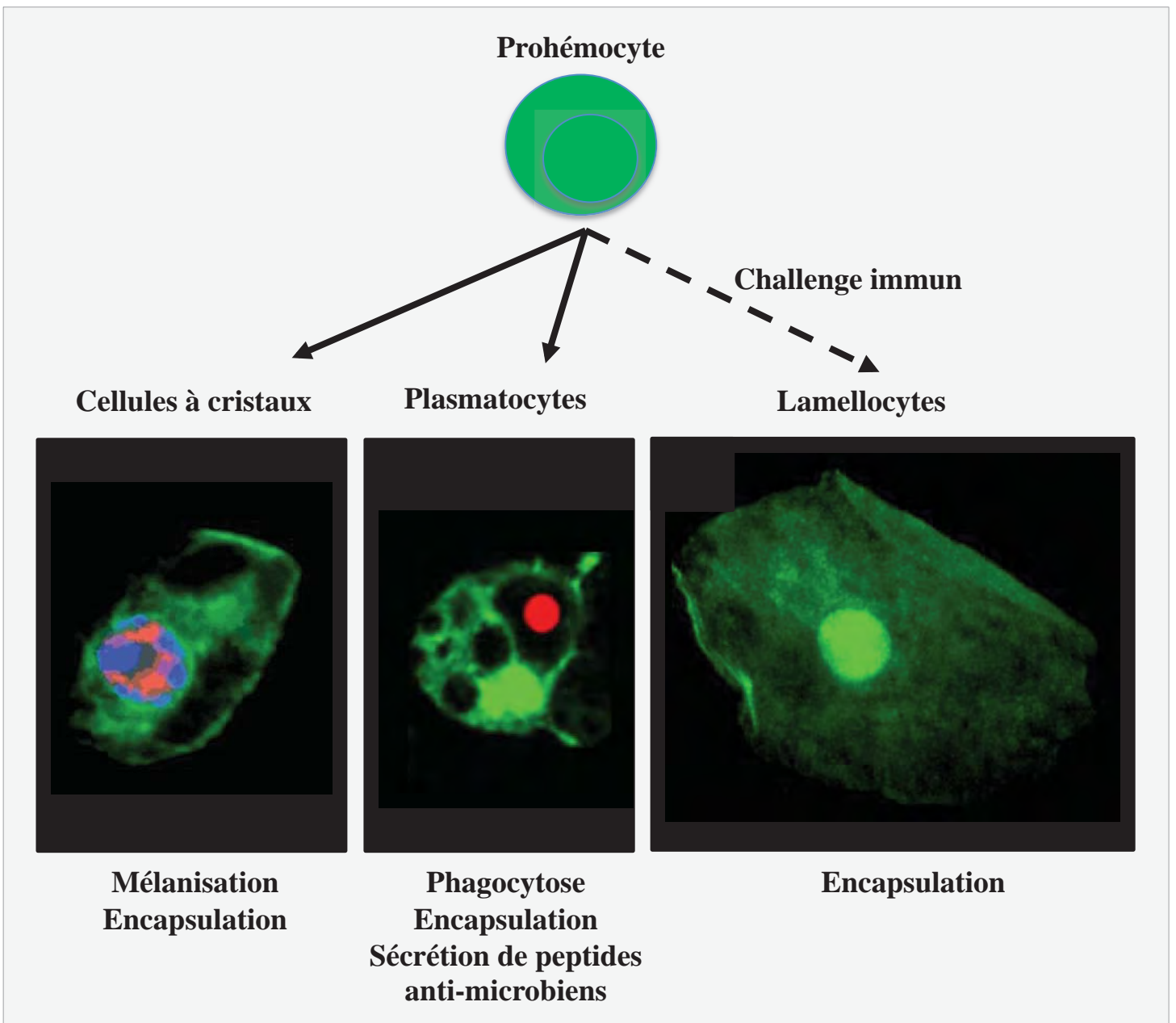
(adapté de Orkin et al., 2008)

La formation des cellules sanguines suit un modèle classiquement appelé modèle pyramidal/hiéarchique dans lequel les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) se trouvent au sommet de la pyramide et vont générer des cellules de plus en plus restreintes dans leur capacité d'auto-renouvellement et de choix de lignage (**figure 1**). Les CSH se caractérisent en effet par deux propriétés fondamentales : leur capacité d'auto-renouvellement à l'infini et leur capacité à se différencier en n'importe lequel des différents lignages sanguins. Ces cellules sont ainsi capables de reconstituer l'intégralité du système hématopoïétique d'un animal irradié après transplantation (Medvinsky et al., 2011). Ces cellules souches vont progressivement restreindre leur capacité de différenciation et acquérir l'expression de différents marqueurs de différenciation pour produire des progéniteurs intermédiaires communs à plusieurs lignages puis des précurseurs « monopotents » et enfin des cellules sanguines matures et fonctionnelles. Ainsi, selon le modèle pyramidal de formation des cellules sanguines, les cellules hématopoïétiques sont divisées en deux grands types de lignages : les globules rouges, les plaquettes, les granulocytes et les macrophages qui sont générés à partir des progéniteurs myéloïdes forment le lignage myéloïde alors que les lymphocytes T, B et NK (Natural Killer) qui sont générés à partir des progéniteurs lymphoïdes forment le lignage lymphoïde (Smith, 2003). La mise en évidence de progéniteurs intermédiaires ayant la capacité à donner à la fois des cellules du lignage myéloïde et des cellules du lignage lymphoïde remet cependant en cause ce modèle binaire (Ceredig et al., 2009; Kawamoto et al., 2010). Ainsi, il semble que les relations entre les différents types cellulaires sanguins soient plus complexes et flexibles que ne le laisse penser cette représentation classique (Eaves, 2015).

Ces cellules assurent trois fonctions fondamentales (Hartenstein, 2006; Iwasaki et Akashi, 2007; Kondo et al., 2001; Orkin, 2000) :

- Les mégacaryocytes produisent les plaquettes qui participent au maintien de l'intégrité de l'organisme en permettant la coagulation du sang et donc la cicatrisation. Lors d'hémorragies ou de blessures, les plaquettes s'agrègent et libèrent des facteurs permettant la formation d'un caillot sanguin.
- les globules rouges encore appelés érythrocytes ou hématies assurent le transport des gaz respiratoires entre les poumons et les différents tissus de l'organisme. Ils permettent donc l'oxygénation des tissus ainsi que l'élimination du dioxyde de carbone, principal déchet produit lors de la respiration.





**Figure 2 : Les différents types d'hémocytes, leur formation et fonction chez *Drosophila melanogaster*.**

Chez la *Drosophila*, les progéniteurs hématopoïétiques ou prohémoocytes se différencient en trois types d'hémocytes. Deux sont produits en permanence : les Cellule à cristaux impliquées dans la mélanisation et les Plasmatocytes responsables de la phagocytose et de la sécrétion (avec le corps gras) de peptides anti-microbiens. Le troisième type d'hémocytes, les lamellocytes ne sont produits qu'en cas de challenge immunitaire comme par exemple le parasitisme par la guêpe *Leptopilina boulardii* permettent l'encapsulation d'objets trop gros pour être phagocytés. Les plasmatocytes et les cellules à cristaux participent également au phénomène d'encapsulation.

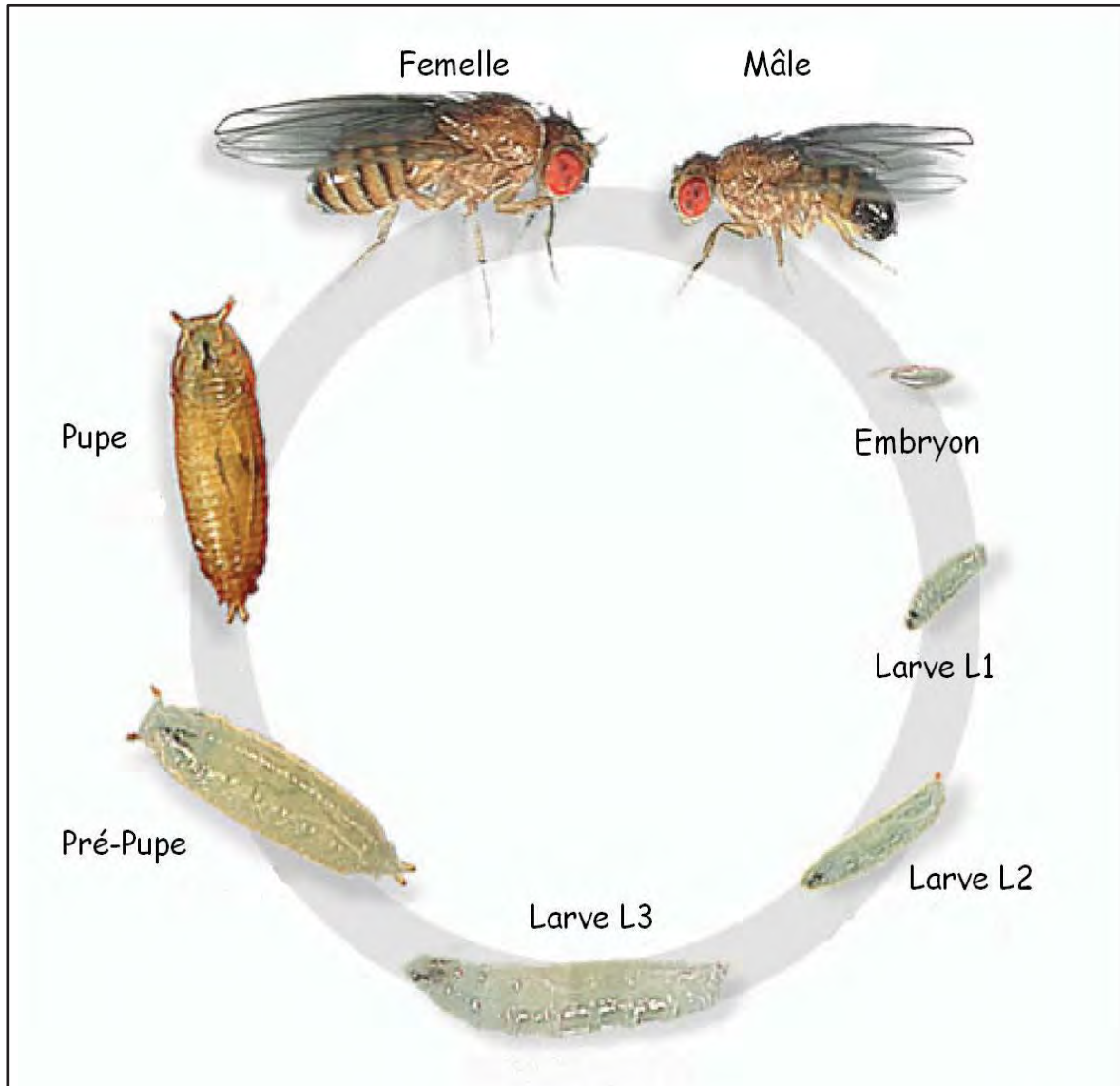
(d'après Evans et al., 2003 ; Stramer et al., 2005 ; Thèse de Joanna Krzemien).

- Les globules blancs ou leucocytes sont quant à eux responsables de la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Il existe 3 grands types de leucocytes : les granulocytes, les macrophages et les lymphocytes, impliqués dans des fonctions spécialisées responsables de l'immunité innée (granulocytes et macrophages) ou de l'immunité adaptative (lymphocytes).
  - Les granulocytes sont subdivisés en trois catégories : les basophiles qui interviennent lors des réactions inflammatoires et allergiques, les neutrophiles qui sont des phagocytes et qui représentent le type sanguin le plus abondant et enfin les éosinophiles qui initient la destruction des parasites.
  - Les macrophages sont responsables de l'élimination par phagocytose des corps apoptotiques et nécrotiques et également des bactéries et autres corps étrangers à l'organisme. Ces cellules ont également un rôle dans l'immunité adaptative puisque suite à la phagocytose d'un pathogène elles vont présenter un antigène à leur surface dans le but d'induire une réaction immunitaire plus spécialisée.
  - Les lymphocytes sont également divisés en trois populations distinctes : les lymphocytes T qui sont responsables de la destruction des cellules reconnues comme étrangères, les lymphocytes B qui sont responsables de la production des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques et les lymphocytes Natural Killer (NK) qui agissent quant à eux de manière indépendante de l'expression d'antigène et qui sont impliqués dans la lyse des cellules étrangères à l'organisme.

On notera que ces différentes populations de cellules sanguines sont subdivisées en sous familles encore plus spécialisées (en particulier les lymphocytes), avec un degré de raffinement toujours plus important au fur et à mesure des nouvelles découvertes.

### **I.A.2. Les cellules sanguines chez la Drosophile**

Chez la Drosophile la diversité des types cellulaires est beaucoup moins élevée que chez les vertébrés puisque les précurseurs sanguins ou prohémyocytes se différencient en seulement trois types de cellules sanguines matures ou hémocytes : les plasmotocytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes (**figure 2**). De part les fonctions qu'ils assurent,



**Figure 3 : Cycle de développement de *Drosophila melanogaster*.**

Le stade embryonnaire dure environ 24h ; il est suivi de trois stades larvaires (L1, L2 et L3) au cours desquels sont élaborés les ébauches des organes et tissus (disques imaginaux) ; enfin au stade pupal la larve s'immobilise dans une cuticule rigide (nommée pupe) et effectue sa métamorphose durant laquelle tous les tissus larvaires sont histolysés. L'adulte émerge une dizaine de jours après la ponte.

principalement la cicatrisation et la réponse cellulaire innée aux infections, ces hémocytes sont apparentés aux cellules myéloïdes des mammifères. Il est à noter ici que la *Drosophile* ne possède pas d'équivalents aux cellules lymphoïdes des vertébrés et semble dépourvue d'immunité adaptative, même si des phénomènes de « mémoire immunitaire » ont été décrits (Pham et al., 2007). De même, la *Drosophile* ne possède pas non plus de cellules hématopoïétiques impliquées dans le transport des gaz respiratoires, l'oxygénation des tissus étant assurée par le système trachéal.

De manière importante, le développement de la *Drosophile* se divise en différents stades (**figure 3**) : le stade embryonnaire, le stade larvaire (divisé en trois stades notés L1 à L3), le stade pupal et le stade adulte. Comme je vais le détailler dans cette partie, chaque stade possède une composition spécifique en hémocytes.

#### **I.A.2.a. Les progéniteurs hématopoïétiques ou prohémoctes**

Les progéniteurs sanguins de la *Drosophile* sont appelés prohémoctes. Ce sont des petites cellules, d'un diamètre d'environ 4 à 6  $\mu\text{m}$ , contenant très peu de cytoplasme et qui possèdent de nombreux ribosomes (Evans et al., 2003; Lanot et al., 2001; Tepass et al., 1994). Les prohémoctes vont se différencier en plasmatocytes, cellules à cristaux ou lamellocytes, mais les étapes de maturation du progéniteur en cellule effectrice sont mal connues.

Le caractère « souche » de ces prohémoctes n'a pas pu être mis en évidence de façon claire. A l'heure actuelle, les études menées suggèrent que la présence de cellules hématopoïétiques indifférenciées capables à la fois d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs types d'hémocytes (principales caractéristiques des cellules souches) se limiterait au premier stade larvaire. En 2010, Minakhina et Steward réalisent une analyse clonale permettant de marquer génétiquement les cellules filles d'un hémocyte pour en suivre le devenir. Cette étude montre que des clones issus de la division d'un prohémoctes tracé à partir du stade embryonnaire ou du premier stade larvaire sont dits « persistants » et sont composés, au troisième stade larvaire, aussi bien de plasmatocytes que de cellules à cristaux. A l'inverse, à partir du second stade larvaire les hémocytes tracés ne génèrent plus que des clones composés d'un seul type cellulaire (plasmatocytes ou cellules à cristaux), suggérant qu'à ce stade ils ont déjà subi une restriction de potentialité et sont donc engagés vers un destin cellulaire particulier (Minakhina et Steward, 2010). De plus, au second et troisième stade larvaire, les prohémoctes n'expriment aucun des marqueurs observés dans d'autres cellules souches de la *Drosophile* ni de marqueurs de division asymétrique, suggérant

une absence de cellules souches hématopoïétiques à ce stade de développement (Krzemien et al., 2010). Ces données suggèrent donc que des cellules progénitrices multipotentes ne sont présentes que transitoirement chez la drosophile et c'est pourquoi le terme « progéniteur » et non « cellule souche » est employé pour désigner l'ensemble des cellules sanguines ayant conservé un caractère indifférencié. On notera cependant que l'étude du caractère « souche » des prohémoscytes n'a été effectuée à ce jour que dans la glande lymphatique, (un des sites d'hématopoïèse chez la larve, cf ci-dessous) et il reste possible que des cellules souches soient présentes ailleurs ou à d'autres stades du développement.

### **I.A.2.b. Les plasmatocytes**

#### I.A.2.b.i. Description

Les plasmatocytes sont retrouvés à tous les stades du développement de la Drosophile et représentent le type cellulaire sanguin majoritaire (environ 95% des hémoscytes totaux). Ce sont des cellules rondes de 8 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre qui possèdent une activité de phagocytose et qui sont donc fonctionnellement apparentées aux macrophages des mammifères. Ainsi, les plasmatocytes sont responsables de l'élimination par phagocytose d'agents invasifs tels que des petits pathogènes, mais aussi des corps apoptotiques et des cellules tumorales. En plus de leur rôle dans l'immunité cellulaire, ils sont impliqués dans la cicatrisation et la production de composants de la matrice extracellulaire et de peptides antimicrobiens (Fauvarque et Williams, 2011; Kounatidis et Ligoxygakis, 2012).

En relation avec leurs fonctions de phagocytose et de cellules sécrétrices, les plasmatocytes possèdent dans leur cytoplasme de nombreux lysosomes et un réticulum endoplasmique développé. Ils possèdent également un réseau d'actine dynamique permettant la formation de nombreux filopodes et lamellipodes nécessaires à leur motilité. En effet, les plasmatocytes embryonnaires et larvaires sont des cellules très mobiles. Ils sont dans un premier temps capables de coloniser l'embryon (Tepass et al., 1994) et d'autre part de migrer jusqu'à un site d'infection, de coupure (Babcock et al., 2008) ou même vers des tumeurs (Cordero et al., 2010; Pastor-Pareja et al., 2008). Ainsi, ils sont spécialisés dans l'immuno-surveillance et sont souvent comparées à des patrouilleurs. Au niveau moléculaire, les plasmatocytes embryonnaires expriment le récepteur PVR récepteur de type PDGF/VEGF (Platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor), alors que les ligands chemoattractants sont exprimés le long des routes de migration dans l'embryon (Brückner et al., 2004). La migration des plasmatocytes vers les sites de coupure ferait quant à elle

intervenir des mécanismes différents puisqu'elle serait déclenchée suite à la sécrétion d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par les cellules endommagées et dépendrait de la voie de signalisation PI3K (Moreira et al., 2010; Wood et al., 2006).

#### I.A.2.b.ii. Rôles des plasmatocytes au cours du développement

De part leur rôle dans la phagocytose des corps apoptotiques et la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire, les plasmatocytes jouent des rôles essentiels au cours du développement de la Drosophile. Pour commencer, au cours de l'embryogenèse ils sont responsables de l'élimination des corps apoptotiques et débris cellulaires formés lors des différents processus développementaux et sont donc essentiels au remodelage des tissus et à la mise en place correcte de différents organes (Bunt et al., 2010; Olofsson et Page, 2005). La reconnaissance de ces cellules apoptotiques nécessite l'expression de deux récepteurs localisés à la surface des plasmatocytes embryonnaires : les récepteurs Croquemort et Draper (respectivement homologue de CD36 et LPS recognition protein chez les mammifères) (Franc et al., 1996; Franc et al., 1999; Kounatidis et Ligoxygakis, 2012; Manaka et al., 2004). Au stade pupal, ils jouent également un rôle fondamental dans l'élimination des cellules détruites lors de la métamorphose (Lanot et al., 2001). Les plasmatocytes représentent également la source principale de matrice extracellulaire recouvrant les différentes surfaces cellulaires en contact avec l'hémolymphe. Parmi les composants de cette matrice on retrouve notamment la Peroxidasine (Nelson et al., 1994), ou encore deux molécules de type collagène IV, Viking (Yasothornsrikul et al., 1997) et Cg25C (Paladi et Tepass, 2004).

#### I.A.2.b.iii. Rôles des plasmatocytes au cours de l'immunité cellulaire

Les plasmatocytes ont un rôle fondamental dans l'élimination des petits pathogènes, bactéries ou champignons, par phagocytose. Ils sont d'ailleurs extrêmement efficaces dans cette tâche puisque les larves infectées par 3000 bactéries sont capables d'en éliminer 95% en seulement 30 minutes et ce sans l'aide des peptides antimicrobiens dont l'expression n'est détectée que quelques heures après l'infection (Kounatidis et Ligoxygakis, 2012). Au niveau moléculaire, ce processus nécessite l'expression de différents récepteurs à la surface des plasmatocytes. Parmi ces récepteurs on retrouve notamment Eater, nécessaire à la reconnaissance et la phagocytose des bactéries (Kocks et al., 2005), ainsi que Nimrod C1, exprimé au stade larvaire uniquement, et également impliqué dans la phagocytose des bactéries (Kurucz et al., 2007a).



#### I.A.2.b.iii. Rôles des plasmacytes au cours de l'immunité humorale

En plus de leur rôle dans la réponse immunitaire cellulaire, les plasmacytes participent à la réponse immunitaire humorale (Lemaitre et Hoffmann, 2007) que je vais donc brièvement décrire ici. L'immunité humorale fait essentiellement intervenir le corps gras (équivalent du foie chez les vertébrés) et va aboutir à la production de peptides antimicrobiens. Ces peptides sont spécifiques du type de pathogène contre lequel ils doivent lutter (Lemaitre et al., 1997). Au niveau moléculaire, la reconnaissance de l'agent pathogène est effectuée par des récepteurs PRRs (pattern recognition receptor). Ces récepteurs sont solubles ou membranaires au niveau du corps gras et des hémocytes (Wang et Ligoxygakis, 2006) et vont reconnaître un type particulier d'agent pathogène puis déclencher une cascade de signalisation spécifique permettant la sécrétion des peptides antimicrobiens adéquats. Ainsi, brièvement, alors que la liaison de bactéries Gram positives ou de champignons va déclencher la voie de signalisation Toll et la synthèse de Drosomycine et de Défensine, la liaison de bactéries Gram négatives va quant à elle activer la voie de signalisation IMD (Immune Deficiency) et la production de Diptéricines et de Cécropine. D'autres voies ont également un rôle dans la réponse humorale notamment la voie JAK/STAT en cas d'infection fongiques ou bactériennes (Lemaitre et Hoffmann, 2007) ou la voie de l'interférence à l'ARN en cas d'infection virale (Kemp et Imler, 2009).

Les plasmacytes participent à la réponse humorale à différents niveaux. D'une part, ils sont eux-mêmes capables de sécréter des peptides antimicrobiens (Cecropin A1, Drosomycin et Diptericin). D'autre part, ils sont impliqués dans la sécrétion de la cytokine Unpaired3 (Upd3) et du ligand Spaetzle (Spz) qui vont activer respectivement les voies de signalisation JAK/STAT et Toll au niveau du corps gras et ainsi favoriser la sécrétion de peptides antimicrobiens par ce dernier (Agaisse et Perrimon, 2004; Shia et al., 2009).

#### **I.A.2.c. Les cellules à cristaux**

Les cellules à cristaux sont des cellules plus grandes, d'environ 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre, et représentent environ 5% de la population totale en hémocytes. Elles sont impliquées dans le phénomène de coagulation et de cicatrisation et sont donc fonctionnellement apparentées à des mégacaryocytes (Theopold et al., 2014). Elles doivent leur nom aux inclusions cristallines qu'elles possèdent dans leur cytoplasme et qui contiennent les enzymes nécessaires au processus de mélanisation, un processus immunitaire propre aux insectes et impliqué dans la cicatrisation et la défense contre les pathogènes. Lors

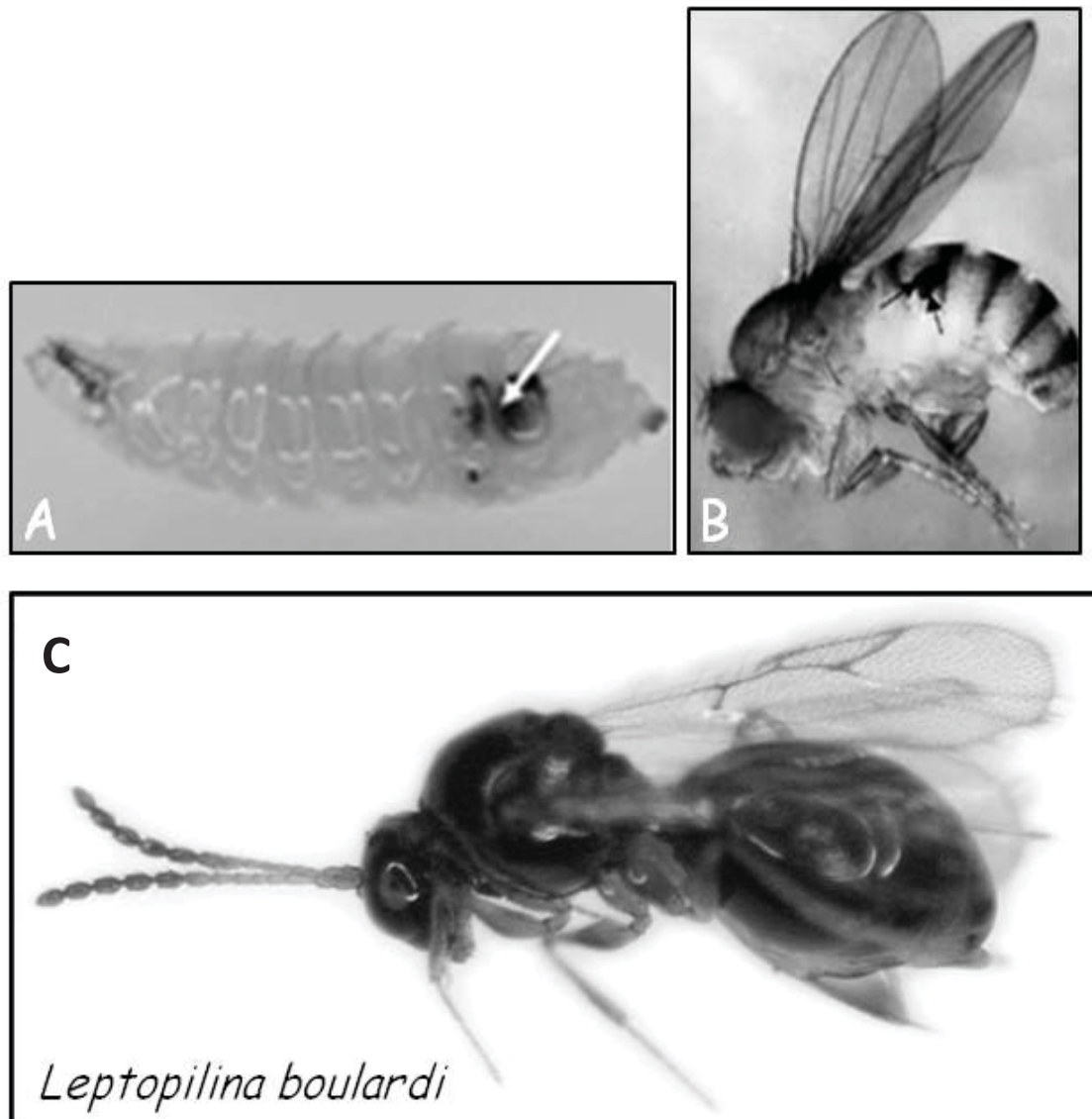
d'infections ou de blessures chez la larve, une activation de la voie JNK va entraîner l'éclatement des cellules à cristaux (Bidla et al., 2007) et la libération de ces enzymes, les prophénoloxidasés (proPO), dans l'hémolymphe. Suite à leur activation via une cascade protéolytique impliquant des sérines protéases, les phénoloxidasés vont catalyser l'oxydation des phénols en quinones qui polymérisent pour former la mélanine. Ce pigment noir peut alors se déposer soit près d'une blessure pour en faciliter la cicatrisation soit autour d'un corps étranger afin de l'isoler (Fauvarque et Williams, 2011). Il a également été proposé que la mélanisation participe à la mort des pathogènes car certains composés intermédiaires de la cascade conduisant à la synthèse de mélanine (radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, anions superoxydes...) seraient cytotoxiques pour ces pathogènes. La *Drosophile* possède trois gènes codants pour les prophénoloxidasés : *ProPO54* (*Bc/CG5779*), *ProPO45* (*mpo/CG8193*) et *ProPO59* (*DoxA3/CG2952*) (Irving et al., 2005). Ces 3 gènes ont été récemment renommés *PPO1*, *PPO2* et *PPO3*, respectivement et *PPO1* et *PPO2*, qui sont exprimés par les cellules à cristaux, participent à la survie des *Drosophiles* à certaines infections microbiennes (Binggeli et al., 2014).

Il est également à noter que l'activation des Prophénoloxidasés et donc de la mélanisation des cellules à cristaux peut être artificiellement déclenchée par chauffage de la larve permettant de visualiser simplement ces cellules à travers la cuticule. Enfin, si chez la larve et l'adulte les cellules à cristaux participent à la réponse immunitaire ainsi qu'à la cicatrisation, chez l'embryon, où elles sont déjà présentes, leur fonction reste inconnue.

#### I.A.2.d. Les lamellocytes

Les lamellocytes sont de grandes cellules aplaties (40 à 50 µm de diamètre) qui permettent l'encapsulation d'objets trop gros pour être phagocytés par les plasmatocytes (**figure 3C**). Ils ne sont produits qu'au cours du développement larvaire dans des conditions spécifiques de challenge immun comme par exemple lors du parasitisme par l'œuf de la guêpe *Leptopilina boulardi*, un hyménoptère endoparasitoïde qui pond ses œufs à l'intérieur des larves de *Drosophiles* (Lanot et al., 2001). Bien qu'environ 50 espèces d'hyménoptères soient capables de parasiter la *Drosophile* (Carton et al., 1986), le parasitisme par la guêpe *L. boulardi* est à l'heure actuelle l'exemple de parasitisme le mieux caractérisé. Ainsi, en cas de parasitisme, la présence de l'œuf de guêpe va déclencher une réponse immunitaire complexe faisant appel aux trois types d'hémocytes : les plasmatocytes vont permettre la reconnaissance du parasite et la différenciation des lamellocytes, les lamellocytes isolent l'œuf en formant,





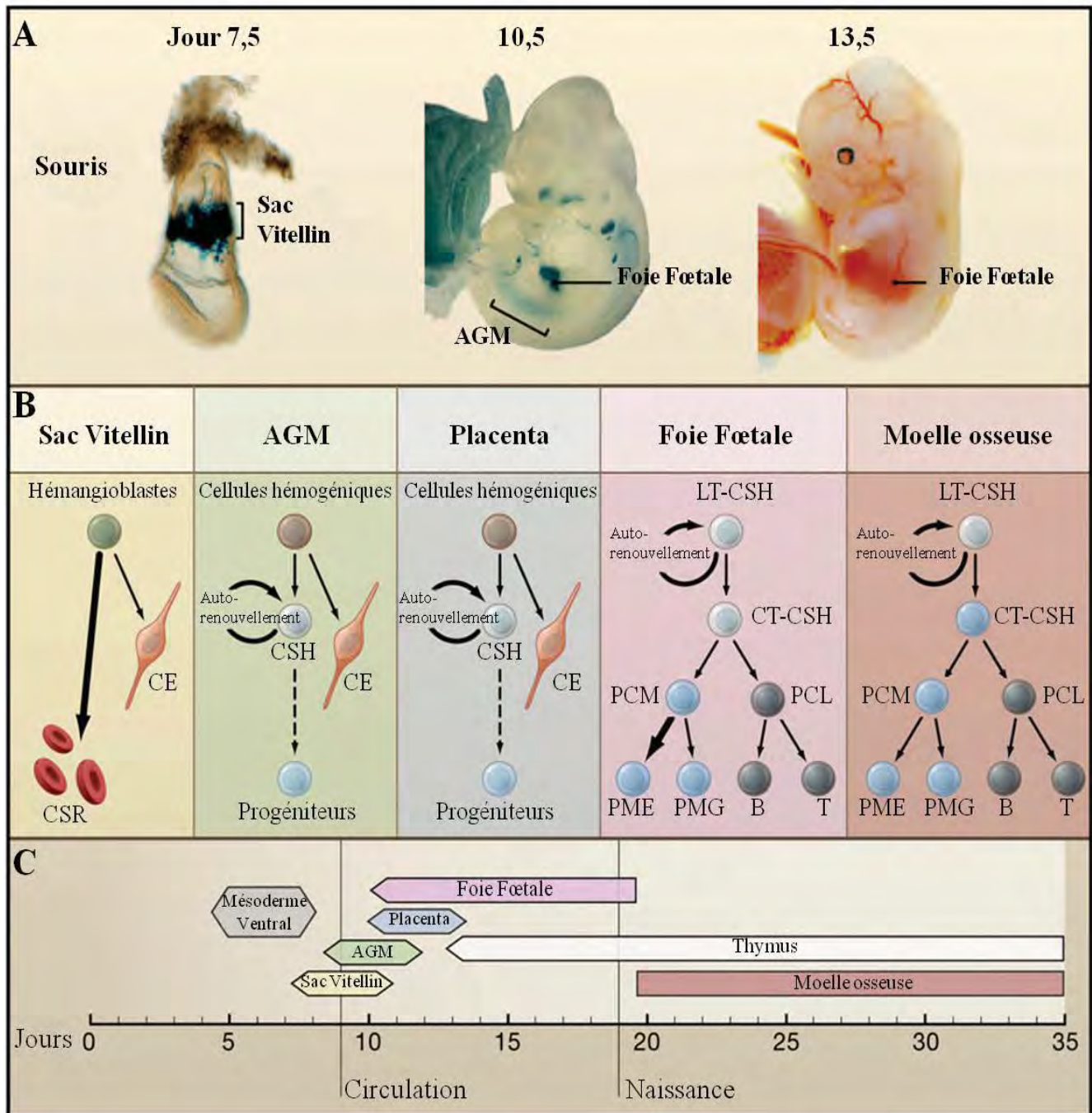
**Figure 4 : Encapsulation et mélanisation de l'œuf de guêpe.**

Lorsque la larve de *Drosophila* est infectée par un œuf de guêpe *Leptopilina boucardi* (A, Flèche blanche), l'œuf est entouré de lamellocytes puis mélanisé et la capsule persiste au cours de la vie adulte (B, flèche noire). Lorsque la *Drosophila* est incapable de mettre en place cette réaction de défense, l'œuf de guêpe se développe au détriment de la larve de *Drosophila*, et une guêpe adulte émerge (C).

autour de lui, une capsule composée de couches de cellules successives et enfin les cellules à cristaux participent à la mélanisation de la capsule. Il est à noter que les lamellocytes expriment également la prophénoloxidase PPO3 (Fauvarque et Williams, 2011) mais ne semblent pas participer à la mélanisation de la capsule puisqu'elle est abolie dans un double mutant *PPO1/PPO2* (Binggeli et al., 2014). Cette capsule entraîne ainsi l'isolement du parasite puis sa mort probablement par asphyxie et/ou suite aux effets cytotoxiques des radicaux libres produit lors de la cascade de mélanisation (Meister, 2004; Vass et Nappi, 2000). Dans les cas où la larve est en incapacité de se défendre contre le parasite celui-ci se développe au détriment de la larve et une guêpe adulte émerge de la puppe (**figure 4**). Au niveau moléculaire, les lamellocytes expriment des molécules d'adhésions telles que l' $\alpha$ -intégrine  $\alpha$ -PS4 et L1CAM (Atila), molécules cruciales pour l'encapsulation correcte de l'œuf (Kounatidis et Ligoxygakis, 2012).

Il est également à noter que l'infection par un parasite n'est pas la seule condition responsable de la production de lamellocytes. En effet, des mutations altérant le développement des cellules hématopoïétiques ou le fonctionnement des tissus immunocompétents comme le corps gras sont connues pour déclencher une réponse immunitaire aberrante (Dearolf, 1998). Celle-ci se caractérise par une hyper-prolifération des hémocytes, une différenciation de lamellocytes et la formation de « masses mélanotiques » (aussi appelées tumeurs mélanotiques ou pseudo-tumeurs) apparentées aux capsules mélanotiques mais produites en absence d'infection. Parmi les mutations décrites on retrouve notamment les mutations activatrices de la voie Toll (Qiu et al., 1998) ou de la voie JAK/STAT (Hou et al., 2002; Luo et al., 1995). De manière intéressante, la présence de tumeurs mélanotiques a également permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse chez la *Drosophile* (Avet-Rochex et al., 2010).

Pour terminer, il est également important de noter ici qu'il semble que la diversité des hémocytes soit plus complexe que ce qui est actuellement décrit. En effet, certains facteurs notamment le facteur de coagulation Hémolectine (Hml) (Goto et al., 2001) et la protéine membranaire Hemese (He) (Kurucz et al., 2003) sont exprimés à la fois par des plasmatocytes et des cellules à cristaux mais l'ensemble des hémocytes ne les expriment pas. L'absence de marqueurs spécifiques de ces populations ou de tests fonctionnels ne permet cependant pas, à l'heure actuelle, de les définir en tant que sous-types d'hémocytes. Parallèlement, le peu de marqueurs dont nous disposons n'offre pas la possibilité de définir les (éventuels) stades de



**Figure 5 : Mise en place de l'hématopoïèse chez la souris.**

(A) L'hématopoïèse débute dans le sac vitellin, puis prend place dans la région de l'AGM (Aorte-Gonade-Mésonephros), le placenta et le foie fœtal. (B) Différents types de cellules sanguines sont produites dans chaque compartiment hématopoïétique. CE : Cellules Endothéliales ; CSR : Cellules Sanguines Rouge ; LT-CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques à Long Terme ; CT-CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques à Court Terme ; PCM : Progéniteur Commun Myéloïde ; PCL : Progéniteur Commun Lymphoïde ; PME : Progéniteur Mégacaryocyte/Erythroïde ; PMG : Progéniteur Macrophage/Granulocyte. (C) Les différents sites hématopoïétique au cours du temps chez la souris. (D'après Orkin et al., 2008)

maturation des cellules sanguines de *Drosophila* avec autant de finesse que chez les mammifères.

## **I.B. Processus de formation des cellules hématopoïétiques**

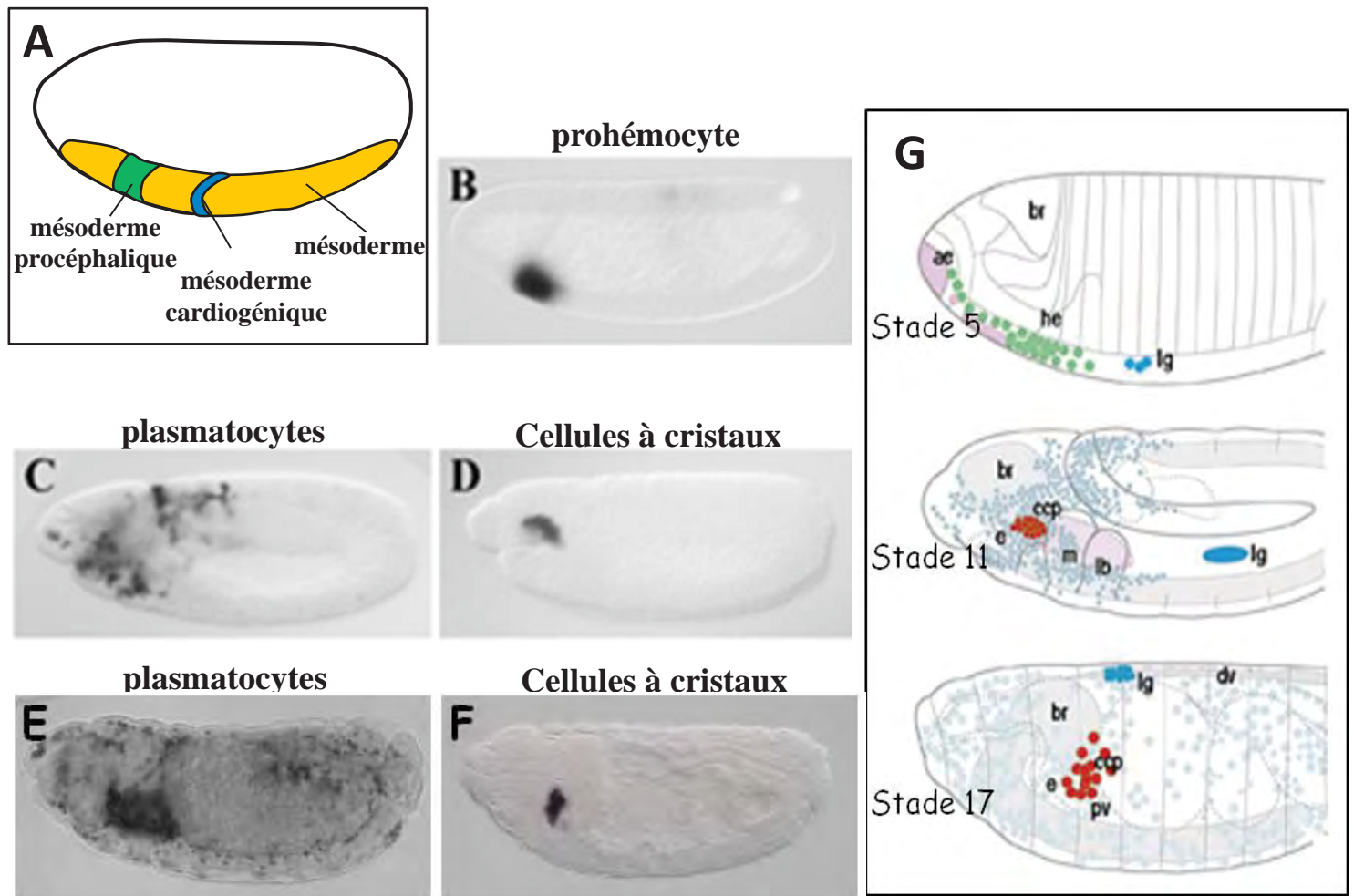
### **I.B.1. Chez les mammifères**

Chez les mammifères (et plus largement chez les vertébrés) deux vagues hématopoïétiques successives appelées respectivement hématopoïèse primitive et hématopoïèse définitive sont à l'origine de la production des différents types cellulaires qui composent le sang.

La première vague hématopoïétique a lieu au cours de la vie fœtale, aux alentours de 7,5 jours de développement chez la souris (**figure 5**). Les premières cellules hématopoïétiques apparaissent dans le mésoderme extra-embryonnaire du sac vitellin et sont principalement à l'origine de macrophages et de cellules érythrocytaires primitives permettant une oxygénation maximale des tissus pendant la croissance de l'embryon (Orkin et Zon, 2008; Traver et Zon, 2002).

La seconde vague hématopoïétique génère quant à elle les CSH définitives qui, de part leur capacité d'auto-renouvellement à l'infini et de différenciation en n'importe lequel des lignages sanguins, servent de réservoir pour la production quotidienne de l'ensemble des cellules hématopoïétiques d'un individu tout au long de sa vie. Ces cellules émergent au cours du développement embryonnaire, à partir des 9,5 jours de développement chez la souris, dans le placenta et la région Aorte-Gonade-Mesonephros (AGM) avant de coloniser les différents sites hématopoïétiques : le foie fœtal, le thymus et la rate, où elles vont se multiplier et se différencier. A la fin de la vie fœtale, les CSH migrent vers la moelle osseuse, principal site hématopoïétique post-natal (Traver et Zon, 2002), où elles résident dans un microenvironnement particulier appelé « la niche hématopoïétique ». Ce concept de niche a été proposé en 1978 suite à l'observation de l'incapacité de la rate à maintenir les cellules souches hématopoïétiques aussi bien que la moelle osseuse qui devait donc produire des facteurs essentiels au maintien du caractère « souche » (Schofield, 1978). Dans la moelle osseuse, la niche est composée d'au moins quatre types cellulaires différents : les ostéoblastes (niche endostéale), les cellules vasculaires (niche vasculaire), les cellules souches mésenchymateuses et les cellules de Schwann (cellules gliales du système nerveux





**Figure 6 : L'hématopoïèse embryonnaire chez la Drosophile.**

(A) Au stade embryonnaire, deux régions au sein du mésoderme vont par la suite devenir des tissus hématopoïétiques : le mésoderme procéphalique qui va générer les plasmatocytes et les cellules à cristaux au cours de l'hématopoïèse embryonnaire, et le mésoderme cardiogénique à partir duquel va se former la glande lymphatique et le tube cardiaque. (B) Visualisation du territoire d'apparition des prohémocytes au stade 5 par hybridation *in situ* dirigée contre *gcm*. (C, E) marquage des plasmatocytes au stades 11 (C) et 17 (E) grâce au marqueur *pxn*. (D, F) marquage des cellules à cristaux grâce au marqueur *PO45* au stades 11 (D) et 17 (F) (Adapté de la thèse à L. Bataillé 2005) (G) Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire. Au stade 5, les prohémocytes sont formés au niveau du mésoderme procéphalique (he, en vert) ; au stade 11, les plasmatocytes commencent à migrer (en gris) et les cellules à cristaux (ccp) se différencient dans la région antérieure (en rouge). Au stade 17, les plasmatocytes ont colonisés tout l'embryon tandis que les cellules à cristaux restent localisées au niveau du proventricule (pv). Les précurseurs de la glande lymphatique (lg, en bleu) sont issus du mésoderme cardiogénique au stade 5 puis migrent dorsalement. En fin d'embryogenèse, la glande lymphatique est située au niveau du vaisseau dorsal (dv) (D'après Lebestky et al., 2000).

périphérique). Cet environnement représente ainsi une structure d'adhésion qui fournit aux CSH les signaux (cytokines, facteurs de croissance, hormones, molécules d'adhésion...) essentiels au maintien de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en n'importe lequel des types cellulaires sanguins, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique (Wilson et al., 2009).

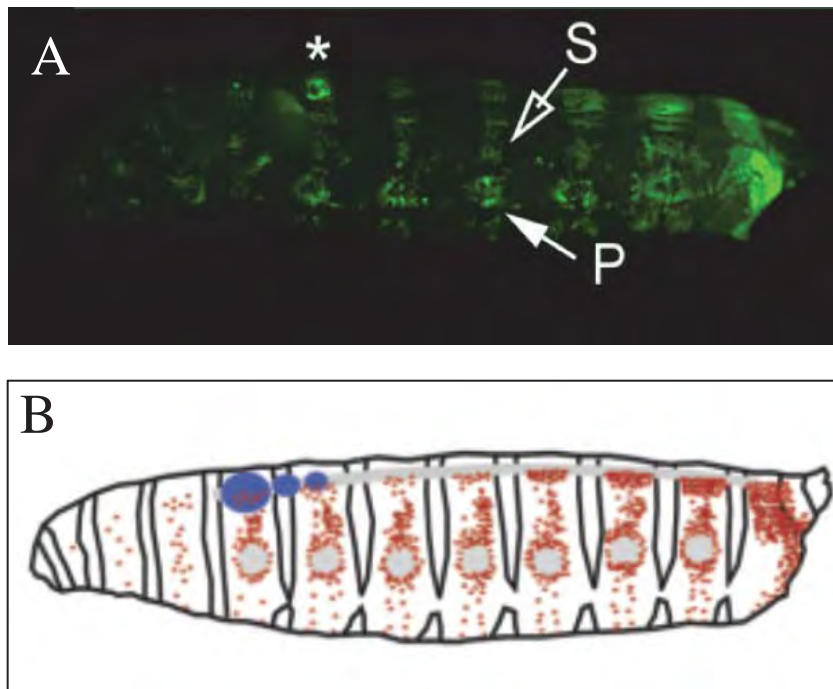
### **I.B.2. Chez la Drosophile**

Chez la Drosophile tout comme chez les mammifères, deux vagues hématopoïétiques se succèdent, la vague embryonnaire et la vague larvaire, pour permettre la production des cellules qui composent le sang appelé ici hémolymph. En effet, la Drosophile n'a pas de vaisseaux sanguins (à l'exception du cœur/vaisseau dorsal, qui est un vaisseau ouvert aux deux extrémités) et son système circulatoire est un système ouvert : l'hémolymph circule librement entre les cellules. Aux stades larvaire et adulte, les contractions du vaisseau dorsal ainsi que les mouvements de l'animal permettent le flux de l'hémolymph.

#### **I.B.2.a. Dans l'embryon de Drosophile**

Dans l'embryon, deux segments mésodermiques sont à l'origine des progéniteurs hématopoïétiques : le mésoderme cardiogénique et le mésoderme procéphalique. Dans le mésoderme cardiogénique thoracique, des cellules vont donner naissance à la fois aux précurseurs du tube cardiaque et de la glande lymphatique, organe hématopoïétique larvaire sur lequel je reviendrai au paragraphe suivant. En effet, bien que cet organe soit spécifié pendant l'embryogenèse, les processus de différenciation en cellules sanguines matures ne débutent qu'au cours de la vie larvaire. Il est également intéressant de noter ici que l'existence d'un progéniteur commun entre les cellules hématopoïétiques et vasculaires (hémangioblaste) a également été mis en évidence chez les vertébrés (Eilken et al., 2009; Lancrin et al., 2009).

Concernant le mésoderme procéphalique il est quant à lui, à l'origine des progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires, environ 80, qui vont proliférer puis se différencier soit en plasmacytes soit en cellules à cristaux (Tepass et al., 1994) (**figure 6**). Les plasmacytes, environ 700, vont migrer et coloniser tout l'embryon alors que les cellules à cristaux, une trentaine environ, restent regroupées en deux paquets situés de part et d'autre du proventricule jusqu'à leur dispersion à la fin de l'embryogénèse (Lebestky et al., 2000). Ces hémocytes « embryonnaires » perdurent dans l'hémocel de la larve, où on en compte de 2500 à 5000 au



**Figure 7 : Les cellules sanguines chez la larve de Drosophile.**

(A) Vue latérale d'une larve L3. L'expression de la GFP dans les cellules sanguines (*pxn-GAL4,UAS-GFP*) permet de distinguer la glande lymphatique (étoile), des hémocytes circulants dispersés ou s'accumulant dans les ilots sessiles (S: « lateral stripes », P: « lateral patches ») (d'après Makhijani et a., 2011). (B) Représentation schématique du système hématopoïétique d'une larve L3. Les cellules sanguines d'origine embryonnaire, circulantes ou attachés au ilots sessiles, sont représentées en rouge. La glande lymphatique est représentée en bleue (d'après Makhijani & Bruckner, 2012).

troisième stade larvaire (Lanot et al., 2001). En plus d'une augmentation du nombre des hémocytes dérivés de l'embryon, le passage au stade larvaire s'accompagne de modifications de l'expression de certains marqueurs de différenciation ; par exemple *singed* ou *glial cell missing* cessent de s'exprimer (Avet-Rochex et al., 2010) alors que *hml* et *hemese* sont activés (Kurucz et al., 2007b; Kurucz et al., 2003). De manière intéressante, il semble aussi qu'une infime proportion de ces hémocytes n'exprime aucun des marqueurs de différenciation connus des plasmatoctes ou des cellules à cristaux et pourrait donc avoir conservé un caractère de progéniteur au stade larvaire (Sinenko et al., 2010). Enfin, des plasmatoctes d'origine embryonnaire sont également retrouvés au stade adulte (Holz et al., 2003).

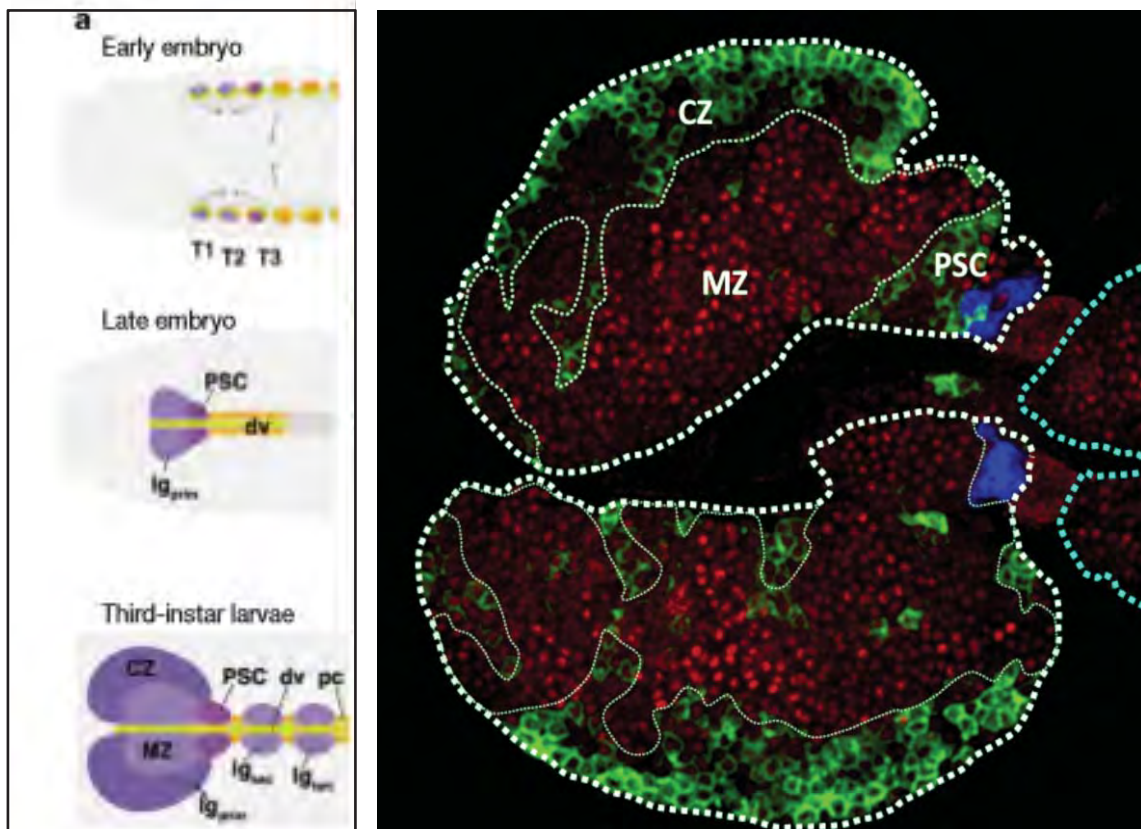
### **I.B.2.b. Chez la larve de *Drosophile***

Chez la larve (comme chez la pupa) la population d'hémocytes est composée d'un mélange d'hémocytes d'origine embryonnaire et d'origine larvaire. Les hémocytes d'origine embryonnaire (*i.e.* dérivés du mésoderme procéphalique) sont retrouvés soit en circulation dans l'hémolymph soit attachés à l'épiderme où ils forment alors des structures appelées îlots sessiles. Les hémocytes d'origine larvaire (*i.e.* dérivés du mésoderme thoracique) sont quant à eux regroupés au sein d'un organe spécialisé : la glande lymphatique (Crozatier et Vincent, 2011; Jung et al., 2005; Lanot et al., 2001) (**figure 7**).

#### **I.B.2.b.i. Les hémocytes circulants et résidents**

Les hémocytes retrouvés en circulation ont la capacité de se regrouper pour former des structures particulières appelées « îlots sessiles ». Ces groupes d'hémocytes, plasmatoctes et cellules à cristaux, sont retrouvés principalement attachés à l'épiderme selon une distribution stéréotypée suivant chacun des segments abdominaux de la larve (Kurucz et al., 2007b; Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011), et aussi, dans des proportions plus restreintes, associés à certains disques imaginaux ou à l'intestin (Kelsey et al., 2012; Zaidman-Rémy et al., 2012). Ces hémocytes ont la capacité de quitter puis de réintégrer les îlots sessiles permettant ainsi un échange entre les hémocytes en circulation dans l'hémolymph et ceux résidents dans les îlots sessiles (Babcock et al., 2008; Welman et al., 2010). Une simple perturbation mécanique permet d'ailleurs de faire entrer ces hémocytes en circulation (Makhijani et al., 2011). Il a récemment été démontré que le récepteur transmembranaire Eater est impliqué dans l'adhésion des hémocytes et est requis dans les plasmatoctes de manière cellulaire autonome pour la formation des îlots sessiles sub-épidermiques. En effet, en sont absente ni les





**Figure 8 : La glande lymphatique, formation et morphologie au troisième stade larvaire.**

(A) Représentation schématique du développement de la glande lymphatique. T1–T3, segments thoraciques; dv, vaisseau dorsal; cb, cardioblastes;  $lg_{prim}$ , lobes primaires de la glande lymphatique;  $lg_{sec/tert}$ , lobes secondaires / tertiaires de la glande lymphatique; pc, cellules pericardiales, (adapté de Mandal et al., 2007). (B) Image confocale d'une glande lymphatique où la zone médullaire (ZM) est marquée en rouge (dome-lacZ), la zone corticale (ZC) est marquée en vert (anti-P1/NimC1), et le centre de signalisation postérieur (PSC) est marqué en bleu (anti-Collier). La limite des lobes primaires est marquée par une ligne en pointillée blanche et celle des lobes secondaires par une ligne pointillée bleue (d'après Benmimoun B., Thèse 2014).

plasmacytes ni les cellules à cristaux ne forment ces structures (Bretscher et al., 2015). De plus, au sein des îlots sessiles, les hémocytes sont en lien étroit avec le système nerveux périphérique qui représenterait un microenvironnement attractif et favorable à la survie et à la prolifération des plasmacytes (Makhijani et al., 2011). Cette observation rappelle le concept de niche hématopoïétique chez les mammifères, niche qui contient également des cellules du système nerveux périphérique.

D'autre part, une étude récente montre que, dans les îlots sessiles, les plasmacytes ont la capacité de se transdifférencier en cellules à cristaux (Leitão et Sucena, 2015). Cette observation est à rapprocher de celle de Markus et al. (2009) qui ont montré qu'en réponse à une infection par *L. boulardi*, les hémocytes des îlots sessiles entrent en circulation et se différencient en lamellocytes. Là encore, plusieurs études indiquent que les lamellocytes seraient issus de la transdifférenciation de plasmacytes (Avet-Rochex et al., 2010; Honti et al., 2010; Márkus et al., 2009; Stofanko et al., 2010). Ainsi, des plasmacytes d'origine embryonnaire capables de phagocytose sont non seulement capables de proliférer mais aussi de se (trans)différencier dans les deux autres types d'hémocytes de la *Drosophile*. Il est également à noter, qu'alors que la glande lymphatique ne libère son contenu qu'à la métamorphose, la quantité d'hémocytes circulants/résidents augmente nettement entre le premier et le troisième stade larvaire (Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011). Ainsi, bien que cette augmentation puisse reposer sur des capacités d'auto-renouvellement des plasmacytes différenciés (Makhijani et al., 2011), la présence d'hémocytes circulants n'exprimant aucun des marqueurs de différenciation connus (Sinenko et al., 2010) laisse ouverte la possibilité qu'ils contribuent eux aussi à cette augmentation et qu'une vague hématopoïétique active ait lieu en circulation et/ou dans les îlots sessiles.

#### I.B.2.b.ii. La glande lymphatique

La glande lymphatique est formée pendant l'embryogenèse à partir du mésoderme cardiogénique (Holz et al., 2003) (**figure 6A et Figure 8A**). Au stade 11, les précurseurs de la glande lymphatique sont répartis en trois groupes de cellules présentes au niveau des segments thoraciques T1, T2 et T3. Au stade 13 de l'embryogenèse, ces cellules vont migrer dorsalement et fusionner pour former le primordium de la glande lymphatique. A la fin de l'embryogenèse, la glande lymphatique est composée d'une paire de lobes, appelés lobes primaires, localisés le long du tube cardiaque et composés d'une vingtaine de prohémoocytes chacun (Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2007). Pendant les deux premiers stades larvaires, les cellules de ces lobes primaires prolifèrent (de 20 cellules par lobe en fin

d'embryogenèse à environ 5000 au troisième stade larvaire) et plusieurs paires de lobes secondaires sont formées postérieurement. Les progéniteurs hématopoïétiques des lobes primaires de la glande lymphatique entrent en quiescence proliférative et commencent à se différencier au début du troisième stade larvaire (Krzemien et al., 2010). Ainsi, à ce stade, alors que les lobes secondaires contiennent presque uniquement des progéniteurs hématopoïétiques qui prolifèrent encore, les lobes primaires présentent une organisation en trois zones (**figure 8B**) : la zone médullaire qui contient les prohémyocytes, la zone corticale qui contient les hémyocytes différenciés issus de la zone médullaire et le « PSC » pour « Posterior Signaling Center » (Jung et al., 2005). Ce dernier participe au maintien de l'état indifférencié des prohémyocytes (Krzemień et al., 2007; Mandal et al., 2007) et est également impliqué dans la réponse au parasitisme (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007; Sinenko et al., 2012). Chez des larves saines, les différents lobes de la glande lymphatique sont entourés d'une couche de matrice extracellulaire et ne libèrent leur contenu dans la circulation qu'à la métamorphose (Lanot et al., 2001).

En réponse à certains challenges immuns tels que l'infection de la larve par *L. boulardi*, les prohémyocytes des lobes primaires et secondaires vont se différencier prématurément et massivement en lamellocytes avant d'être relargués en circulation (Krzemien et al., 2010; Lanot et al., 2001). Il a été démontré que cette capacité de réponse au parasitisme requiert le PSC puisqu'en son absence aucun lamellocyte n'est formé (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007). Plus récemment il a été proposé que le PSC agisse comme un capteur du stress oxydatif produit en contexte d'infection et comme source de signal induisant la différenciation des lamellocytes en circulation (Sinenko et al., 2012).

### **I.B.2.c. Chez la *Drosophila* adulte**

Les hémyocytes présents chez l'adulte sont issus à la fois de la vague embryonnaire et de la vague larvaire (Holz et al., 2003). Jusqu'à récemment, on considérait que la population d'hémyocytes adulte était composée uniquement de plasmatocytes différenciés, exprimant le marqueur Nimrod C1, capables de produire des peptides antimicrobiens, de phagocyter des bactéries (Elrod-Erickson et al., 2000; Lanot et al., 2001) et dont le nombre décline au cours de la vie adulte (Mackenzie et al., 2011). Cependant, ce modèle a été écorné par l'identification d'au moins deux sous populations de macrophages aux fonctions potentiellement différentes (Clark et al., 2011) et à la mise en évidence de cellules à cristaux (Honti et al., 2014) chez l'adulte. De plus, une étude récente suggère qu'un processus

hématopoïétique actif a lieu au niveau de groupes de cellules sanguines localisés à proximité du cœur dans les segments abdominaux A1 à A4 des *Drosophiles* adultes (Ghosh et al., 2015). Ces clusters contiennent des hémocytes embryonnaires et larvaires (plasmacytes et cellules à cristaux) mais aussi des progéniteurs hématopoïétiques qui seraient issus des lobes les plus postérieurs de la glande lymphatique. De façon intéressante, les auteurs ont pu observer l'apparition de cellules différenciées (plasmacytes capables de phagocytose et cellules à cristaux) au cours de la vie adulte et ils ont mis en évidence qu'une fraction au moins des hémocytes adultes est capable de proliférer en réponse à une infection bactérienne (alors qu'ils sont normalement tous quiescents).

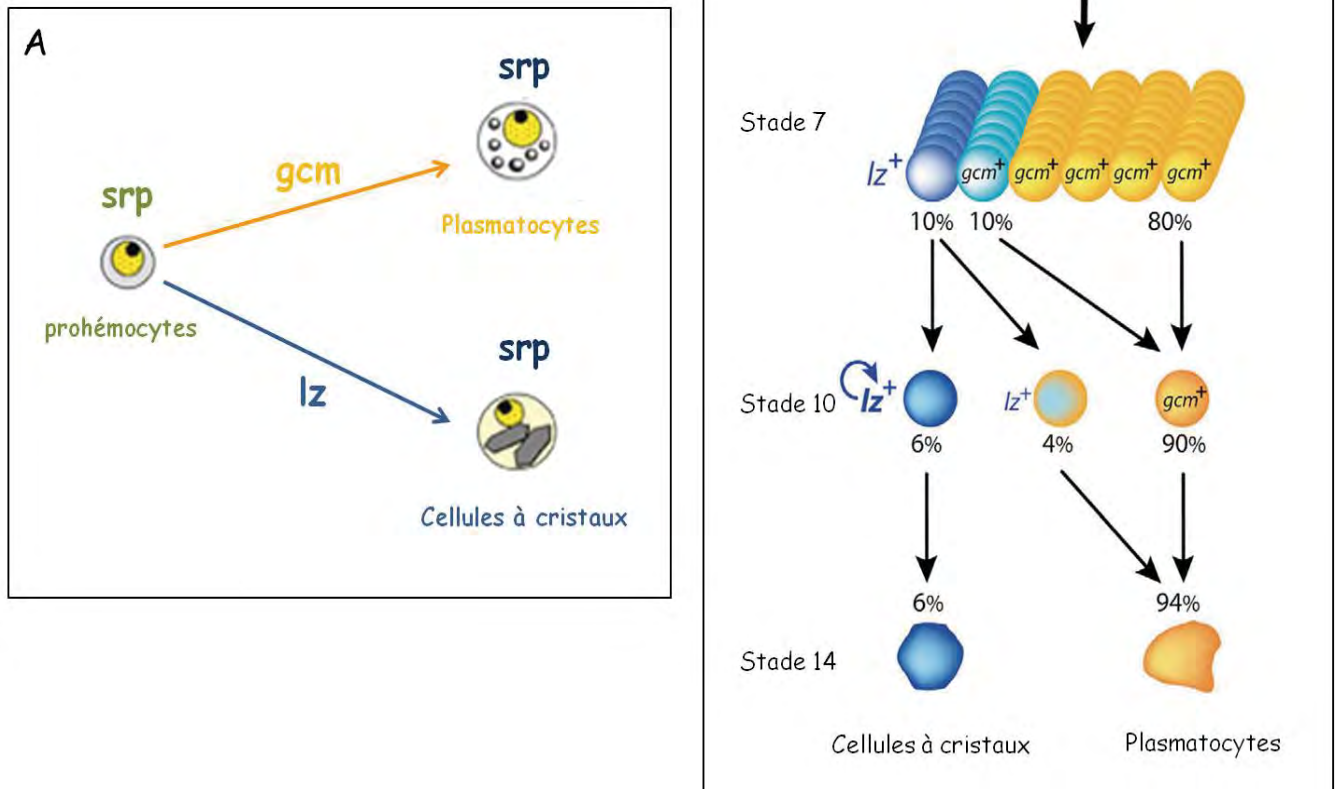
## **I.C. Le contrôle moléculaire de l'hématopoïèse**

Les travaux réalisés sur des cellules sanguines en culture ou dans des organismes modèles comme la souris, le poisson zèbre et plus récemment la *Drosophile* ont permis d'identifier de nombreux facteurs de transcription (GATA, RUNX...) et voies de signalisation (Notch, JAK/STAT...) qui contrôlent différents aspects du développement des cellules sanguines, tels que la spécification des progéniteurs sanguins, leur prolifération ou leur différenciation. De façon remarquable, ces travaux ont mis en évidence une conservation importante des gènes régulant l'hématopoïèse de la *Drosophile* à l'Homme (Hartenstein, 2006; Martinez-Agosto et al., 2007). Je décrirai ici les principaux acteurs impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse de la *Drosophile* chez l'embryon puis chez la larve en insistant sur certains parallèles qui peuvent être dressés avec les mammifères.

### **I.C.1. Contrôle moléculaire de l'hématopoïèse chez l'embryon de *Drosophile***

#### **I.C.1.a Spécification et différenciation des hémocytes embryonnaires**

Chez l'embryon de *Drosophile* la population de progéniteurs hématopoïétiques ou pro-hémocytes est déterminée dès le stade blastoderme et se caractérise par l'expression, au sein du mésoderme antérieur, du facteur de transcription de type GATA Serpent (SRP) (Rehorn et al., 1996; Waltzer et al., 2010). L'expression de SRP est nécessaire à la



**Figure 9 : Contrôle moléculaire de l'hématopoïèse embryonnaire chez la Drosophile.**

(A) *srp* est exprimé dans les prohémocytes et son expression est maintenue dans les hémocytes différenciés. *gcm* est nécessaire à la différenciation des plasmatocytes tandis que *lz* est requis pour la différenciation des cellules à cristaux. (B) Représentation schématique du destin cellulaire durant l'embryogenèse. Initialement tous les prohémocytes expriment *gcm* mais pas *lz*. La transcription de *gcm* est ensuite éteinte et celle de *lz* activée uniquement dans la première rangée de prohémocytes, tandis que les autres se différencient en plasmatocytes. 60% des cellules maintiennent l'expression de *lz* grâce à une boucle d'auto-activation et se différencient en cellules à cristaux ; dans les 40% restant la présence résiduelle de Gcm interfère avec l'expression de *lz* et induit la différenciation de ces cellules en plasmatocytes (D'après Bataillé et al., 2005).



spécification des hémocytes embryonnaires et maintenue dans l'ensemble des cellules sanguines matures aux différents stades de développement de la *Drosophile*, ce facteur est d'ailleurs dit « panhémocytaire » (**Figure 9A**). En condition de perte de fonction pour *srp* des prohémyocytes apparaissent en nombres restreints dans l'embryon puis disparaissent rapidement sans qu'il y ait différenciation de plasmacytes ou de cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996). Chez les mammifères trois des six facteurs de transcription de type GATA (GATA-1, -2 et -3) sont impliqués à différentes étapes du processus hématopoïétique de l'émergence des cellules souches hématopoïétiques à leur différenciation en divers lignages (Orkin et al., 1998). GATA-2 contrôle la prolifération et la survie des CSH (Shimizu et Yamamoto, 2005) alors que GATA-1 intervient dans la différenciation des érythrocytes, des mégacaryocytes et des éosinophiles (Tsang et al., 1998) et GATA-3 dans la différenciation des lymphocytes T (Kurata et al., 2003; Zhou et Ouyang, 2003). Chez la *Drosophile* il existe cinq facteurs GATA et seuls deux, SRP et Panier (PNR), sur lequel je reviendrai plus tard, sont connus pour participer à l'hématopoïèse. De par ses fonctions dans la spécification des progéniteurs sanguins, SRP se rapproche fonctionnellement de GATA-2, mais comme GATA-1 et -3 il participe aussi à la différenciation des lignages sanguins et joue donc un rôle prééminent au cours de l'hématopoïèse chez la *Drosophile*.

Si on ne connaît pas les facteurs qui contrôlent l'amplification des progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires, les mécanismes moléculaires régulant leur choix de destin et leur différenciation ont été assez bien décrits. Les progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires sont bipotents : ils peuvent se différencier aussi bien en plasmacytes qu'en cellules à cristaux et la ségrégation entre ces deux lignages repose sur une balance entre les facteurs de transcription de type GATA, RUNX et GCM. Alors que la différenciation des plasmacytes dépend des facteurs Glial Cell Missing (GCM) et GCM2, celle des cellules à cristaux nécessite le facteur de transcription de type RUNX, Lozenge (LZ) (Alfonso et Jones, 2002; Bataillé et al., 2005; Fossett et al., 2003; Lebestky et al., 2000; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003). Chez les mammifères, à l'heure actuelle il n'y a pas de rôle connu de GcmA ou de GcmB (homologues de GCM1 et GCM2) dans l'hématopoïèse alors qu'à l'inverse, les trois gènes de la famille RUNX, sur lesquels je reviendrai au chapitre II, participent à une ou plusieurs étapes du processus hématopoïétique (Blyth et al., 2005).

L'expression de *gcm* et *gcm2* est détectée dès le stade 5 de l'embryogenèse (stade blastoderme) dans l'ensemble des prohémyocytes exprimant SRP puis est restreinte aux plasmacytes (Bataillé et al., 2005). Les progéniteurs des cellules à cristaux sont détectés au

stade 7 lorsque les prohémyocytes les plus antérieurs dans le mésoderme cessent d'exprimer *gcm* et *gcm2* et commencent à exprimer *lz*. Parmi ces progéniteurs, environ 60% vont maintenir l'expression de *lz* grâce à une boucle de rétrocontrôle positif et se différencier en cellules à cristaux. La présence résiduelle de GCM dans les autres progéniteurs (40%) va inhiber l'expression de *lz* et permettre leur différenciation en plasmacytes (Bataillé et al., 2005) (**Figure 9B**).

Un autre régulateur du choix de lignage est le gène *u-shaped* (*ush*), un membre de la famille Friend Of GATA (FOG), qui est également exprimé dans les progéniteurs sanguins dès le stade 8 et est maintenu dans les plasmacytes (Muratoglu et al., 2007). Les facteurs FOG agissent spécifiquement comme régulateurs (co-activateurs ou co-répresseurs transcriptionnel, selon les contextes) des facteurs GATA. Chez les mammifères, FOG-1 en association avec GATA-1 promeut l'érythropoïèse (Tsang et al., 1998) et réprime la formation des éosinophiles (Querfurth et al., 2000). Chez la Drosophile, USH inhibe le choix de destin cellulaire « cellule à cristaux » et promeut le destin « plasmacyte » (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2003); il joue aussi un rôle de co-répresseur par rapport à certaines cibles de SRP dans les plasmacytes (Waltzer et al., 2003).

Alors que l'expression de *gcm* et *ush* dans les prohémyocytes et les plasmacytes ainsi que le maintien de *lz* dans les cellules à cristaux dépendent du facteur GATA SRP (Muratoglu et al., 2007; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003), on ne connaît pas à ce jour le signal responsable de l'induction de *lz* dans les progéniteurs sanguins embryonnaires. Par contre, il a été montré que LZ va interagir physiquement et fonctionnellement avec SRP pour induire la transcription des gènes spécifiques des cellules à cristaux tels que les prophénoloxidasés et promouvoir leur différenciation. (Ferjoux et al., 2007; Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2003) De façon intéressante, cette collaboration GATA/RUNX est conservée au cours de l'évolution. En effet, chez les mammifères, le couple GATA2/RUNX1 joue un rôle clé dans la régulation des gènes exprimés dans les CSH (Wilson et al., 2010) et, au cours de la différenciation des mégacaryocytes RUNX1 interagit avec le facteur de transcription GATA1 pour induire la transcription de nombreux gènes spécifiques de ce lignage (Elagib et al., 2003; Pencovich et al., 2011; Tijssen et al., 2011). Cette conservation de l'interaction entre les facteurs GATA et les facteurs RUNX fait de la coopération entre les facteurs SRP et LZ un excellent paradigme pour étudier comment le complexe GATA/RUNX régule la transcription et le développement des cellules sanguines de la Drosophile aux vertébrés.

### **I.C.1.b. Les précurseurs de la glande lymphatique**

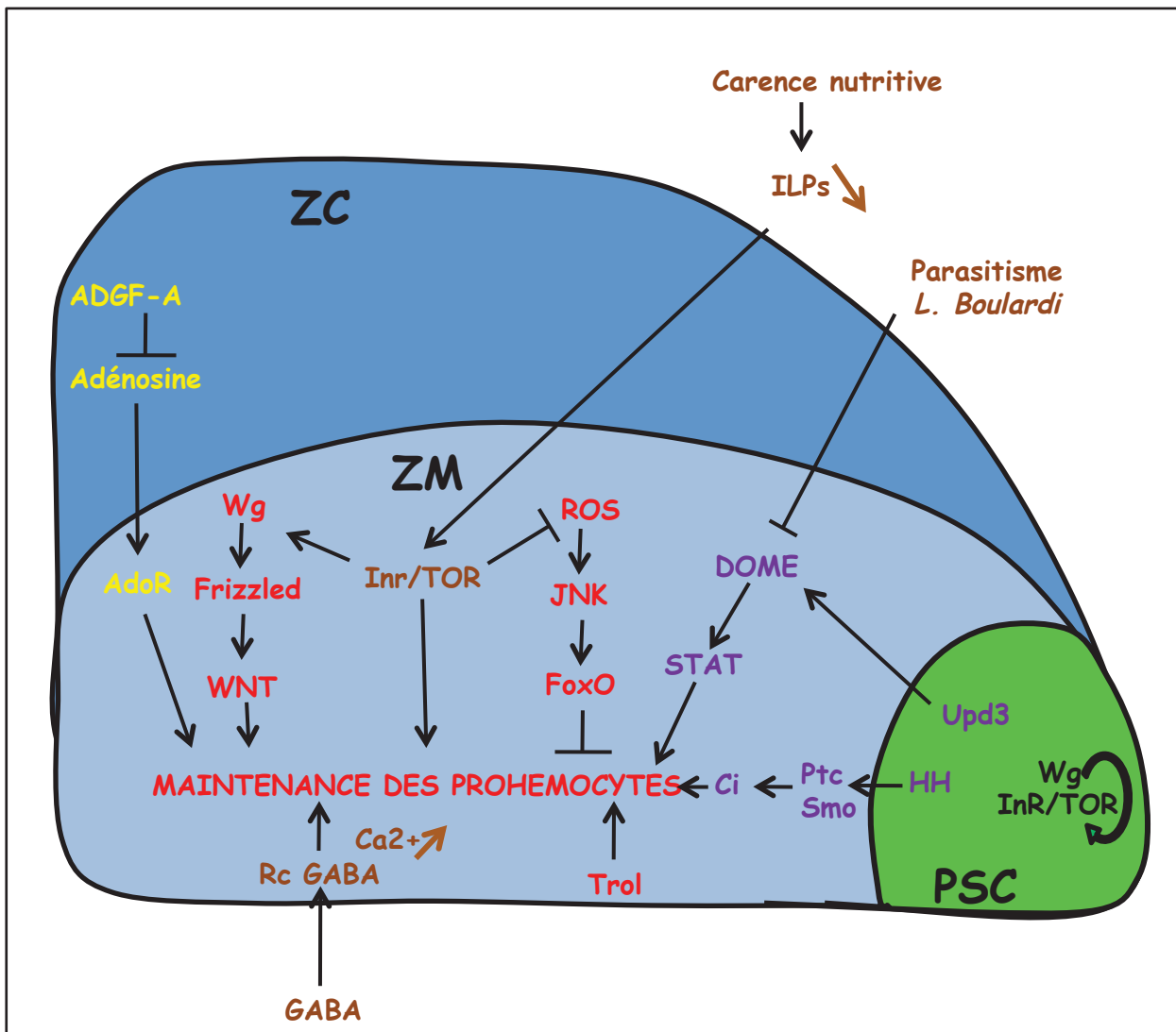
Les précurseurs de la glande lymphatique sont spécifiés au cours de l'embryogenèse à partir de cellules regroupées en trois clusters localisés au niveau des segments thoraciques T1, T2 et T3 qui vont, au stade 11, exprimer la protéine Odd-skipped (ODD) ainsi que le facteur de transcription de la famille EBF (Early B-Cell Factor) Collier (COL), avant d'exprimer SRP à partir du stade 12. Bien que dans un mutant *srp*, la glande lymphatique ne soit pas formée, les précurseurs exprimant ODD/COL sont eux spécifiés (Crozatier et al., 2004). La spécification du PSC requiert quant à elle l'expression du facteur de transcription homéotique Antennapedia (ANTP) et de COL (Crozatier et al., 2004; Jung et al., 2005; Lebestky et al., 2003; Mandal et al., 2004). L'expression de SRP et ODD va être maintenue dans l'ensemble des cellules de cet organe alors que l'expression de COL et ANTP va se restreindre au PSC (Crozatier et al., 2004; Jung et al., 2005; Mandal et al., 2007). On notera que comme chez les mammifères où la voie Notch est requise pour l'émergence des CSH et l'expression de GATA2 dans l'AGM (Bigas et Espinosa, 2012; Robert-Moreno et al., 2005), Notch participe à l'induction du destin « hématopoïétique » versus « endothélial » des cellules du mésoderme cardiogénique de la Drosophile notamment en activant l'expression de SRP (Mandal et al., 2004).

## **I.C.2. Contrôle moléculaire de l'hématopoïèse larvaire chez la Drosophile**

Au cours de l'hématopoïèse larvaire, de nombreuses voies de signalisation ont été identifiées comme étant impliquées dans le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique. Ces voies de signalisation vont permettre de réguler d'une part le maintien du caractère « souche » des progéniteurs hématopoïétiques et d'autre part leur différenciation en hématocytes matures. De plus, alors que l'hématopoïèse embryonnaire est un processus extrêmement stéréotypé qui ne semble régulé que par des facteurs intrinsèques, l'hématopoïèse larvaire est quant à elle également régulée par des facteurs environnementaux tels que les infections, la disponibilité en nutriments ou encore le stress hypoxique.

### **I.C.2.a. Contrôle du maintien du caractère indifférencié des prohématocytes**





**Figure 10 : Contrôle du maintien du caractère indifférencié des prohémodocytes dans la glande lymphatique.**

Représentation schématisée des principales voies contrôlant le maintien du caractère indifférencié des prohémodocytes dans la glande lymphatique. Ce maintien est régulé par les prohémodocytes eux-mêmes (voies en rouge), par des signaux issus des cellules du PSC (violet), ou des cellules différenciées de la zone corticale (jaune) ainsi que par des signaux systémiques (marron).

Les réseaux géniques contrôlant le maintien des progéniteurs sanguins de la *Drosophile* ont été principalement caractérisés dans la glande lymphatique. En effet des progéniteurs hématopoïétiques sont présents dans la glande lymphatique jusqu'en fin de stade L3 (Jung et al., 2005). De plus l'organisation particulière de cet organe en a fait un modèle de choix pour l'identification et l'étude des voies de signalisation contrôlant la balance entre le maintien du caractère « souche » des progéniteurs et leur différenciation en hémocytes matures. Ainsi, il a été montré que ce contrôle est assuré à la fois de manière autonome par les cellules indifférenciées de la zone médullaire et de manière non autonome en réponse à des signaux venant du PSC et des cellules différenciées de la zone corticale ou par des signaux d'origine systémique (**Figure 10**).

#### I.C.2.a.i. Maintien autonome des prohémyocytes de la zone médullaire

Dans la zone médullaire, les progéniteurs sanguins expriment le ligand Wingless (Wg) qui en se liant à ses récepteurs Frizzled (Fz) et Fz2 active la voie de signalisation WNT canonique et favorise le maintien de ces cellules dans l'état indifférencié (Sinenko et al., 2009). De manière intéressante, l'expression de Wg et Fz2 par les cellules du PSC est aussi requise pour promouvoir la prolifération de ces cellules. La voie WNT agit donc à deux niveaux dans le maintien indifférencié des prohémyocytes : directement sur les prohémyocytes et indirectement en contrôlant la taille du PSC et donc son activité de niche (cf ci-dessous). Chez les mammifères, cette voie joue également un rôle important dans le développement de différents lignages hématopoïétiques ainsi que dans le fonctionnement de la niche hématopoïétique et, chez l'homme, elle contribue à l'apparition de nombreux cancers dont des hémopathies malignes (Deshpande et Buske, 2007; Jauregui et al., 2008; Reya et Clevers, 2005).

Il a également été démontré que le maintien de l'état indifférencié des cellules sanguines dépend du niveau de ROS (Owusu-Ansah et Banerjee, 2009). Alors que les prohémyocytes présentent un niveau élevé de ROS, les hémocytes ont eux un niveau plus faible. De plus, alors que la diminution du niveau de ROS dans les prohémyocytes retarde leur différenciation, l'augmentation de ce niveau entraîne leur différenciation prématurée. Cette différenciation précoce passe par l'activation de la voie de signalisation Jun N-terminal kinase (JNK) qui va à son tour activer le facteur de transcription FoxO. De façon intéressante, le niveau de ROS est aussi apparu comme un régulateur du renouvellement et de la quiescence des CSH chez les mammifères ainsi que dans développement des leucémies (Sardina et al., 2012).

De plus, des composants de la matrice extracellulaire, tels que le protéoglycane Trol, sont exprimés à plus haut niveau dans la zone médullaire que dans la zone corticale et il a été montré que leur présence, en promouvant l'activité de la voie de signalisation Hedgehog (Hh) et en inhibant celle du FGF (Fibroblast Growth Factor) au sein des prohémyocytes joue un rôle important dans le maintien indifférencié de ces cellules (Dragojlovic-Munther et Martinez-Agosto, 2013; Grigorian et al., 2013).

#### I.C.2.a.ii. Signaux issus des cellules du PSC

Selon le modèle généralement proposé, les cellules du PSC servent de niche hématopoïétique requise pour le maintien indifférencié des progéniteurs sanguins de la glande (Krzemień et al., 2007; Mandal et al., 2007). Son action passe notamment par l'expression des ligands Upd3 et Hh, qui vont respectivement activer les voies de signalisation JAK/STAT et Hedgehog dans les prohémyocytes. Ainsi, une modification de la taille ou de l'activité du PSC s'accompagne souvent d'une modification de l'équilibre entre cellules progénitrices et différenciées (Benmimoun et al., 2012; Khadilkar et al., 2014; Mandal et al., 2007; Mondal et al., 2011; Pennetier et al., 2012; Sinenko et al., 2009; Tokusumi et al., 2012). Cependant, les résultats récents de notre équipe montrent que le PSC n'est pas absolument requis pour le maintien des prohémyocytes (Benmimoun et al., 2015).

Chez les mammifères, les différents signaux issus de la niche hématopoïétique jouent eux aussi un rôle important dans le maintien des CSH et le développement de leucémies (Al-Drees et al., 2015). Cependant, une implication directe des voies JAK/STAT ou Shh, qui jouent des rôles importants dans l'hématopoïèse et les leucémies, n'a pas encore été mise à jour au niveau de la niche.

#### I.C.2.a.iii. Signaux issus des cellules différenciées de la zone corticale

D'autre part, il a été montré que les cellules sanguines différenciées envoient un signal en retour vers les progéniteurs sanguins. Ainsi, la production, par les hémocytes de la zone corticale du facteur de croissance ADGFA (Adenosine Deaminase-related Growth Factor A) va contrôler/diminuer le niveau extracellulaire d'Adénosine et inhiber la différenciation des prohémyocytes en bloquant la voie Adénosine/AdoR (Mondal et al., 2011). Il est également intéressant de noter ici qu'il a été proposé qu'en contexte d'infection, la sécrétion d'adénosine par les cellules circulantes permette la mise à disposition, pour les hémocytes circulants, du glucose stocké qui va alors représenter une source énergétique supplémentaire lors du processus de défense en cas d'infection, processus coûteux en énergie (Bajgar et al., 2015).

Ce processus de régulation du destin cellules sanguines progénitrices par des cellules sanguines différenciées est aussi observé chez les mammifère où par exemple, les mégacaryocytes présents dans la moelle osseuse favorisent la quiescence des CSH (Bruns et al., 2014).

#### I.C.2.a.iiii. Signaux systémiques

Le maintien indifférencié des prohémyocytes de la glande lymphatique est également régulé par des signaux systémiques. En particulier, il dépend de l'état nutritionnel de la larve de *Drosophila*. En effet, en condition de carence nutritive, le corps gras (équivalent du foie chez les mammifères) va moduler la sécrétion d'Insuline-like peptides (ILP) par la glande prothoracique et la baisse du niveau d'ILP dans l'hémolymphe va diminuer l'activité de la voie Insuline/Target of Rapamycin (TOR) dans les prohémyocytes et conduire à leur différenciation prématurée (Benmimoun et al., 2012; Dragojlovic-Munther et Martinez-Agosto, 2012; Shim et al., 2013a). Cet effet de la voie InR/TOR passerait soit par une diminution de l'expression Wg soit par une augmentation du niveau de ROS dans les prohémyocytes (Dragojlovic-Munther et Martinez-Agosto, 2012; Shim et al., 2013a). Il est à noter que la voie InR/TOR contrôle également de manière cellulaire autonome la taille du PSC (Benmimoun et al., 2012; Tokusumi et al., 2012). D'autre part, il a été montré que la sécrétion dans l'hémolymphe du neurotransmetteur GABA par des récepteurs olfactifs de la larve participe au maintien indifférencié des prohémyocytes en activant le récepteur au GABA et en maintenant ainsi des niveaux élevés de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol de ces cellules (Shim et al., 2013b). Enfin, en réponse à une infection par *L. bourlardi*, les prohémyocytes de la glande vont se différencier précocement et produire massivement des lamellocytes. Bien que les signaux systémiques impliqués restent à identifier, il a été montré qu'une inactivation de la voie JAK/STAT dans les prohémyocytes est essentielle pour cette réponse immune cellulaire au parasitisme (Makki et al., 2010).

#### C.2.a.iiii. Le cas des progéniteurs circulants

A l'heure actuelle, la présence de progéniteurs hématopoïétiques en circulation chez la larve reste une question en suspens. En effet, il a été montré qu'en circulation une très faible proportion ( $\pm 1\%$ ) des hémocytes n'expriment aucun des marqueurs de différenciation connus des plasmatocytes ou des cellules à cristaux mais, comme les prohémyocytes de la glande lymphatique, expriment Wg et présentent des niveaux de ROS élevés (Sinenko et al., 2010). Cependant les capacités de différenciation de cette population n'ont pas été clairement

démontrées et il reste à établir s'il s'agit d'une population particulière d'hémocytes différenciés ou de véritables progéniteurs.

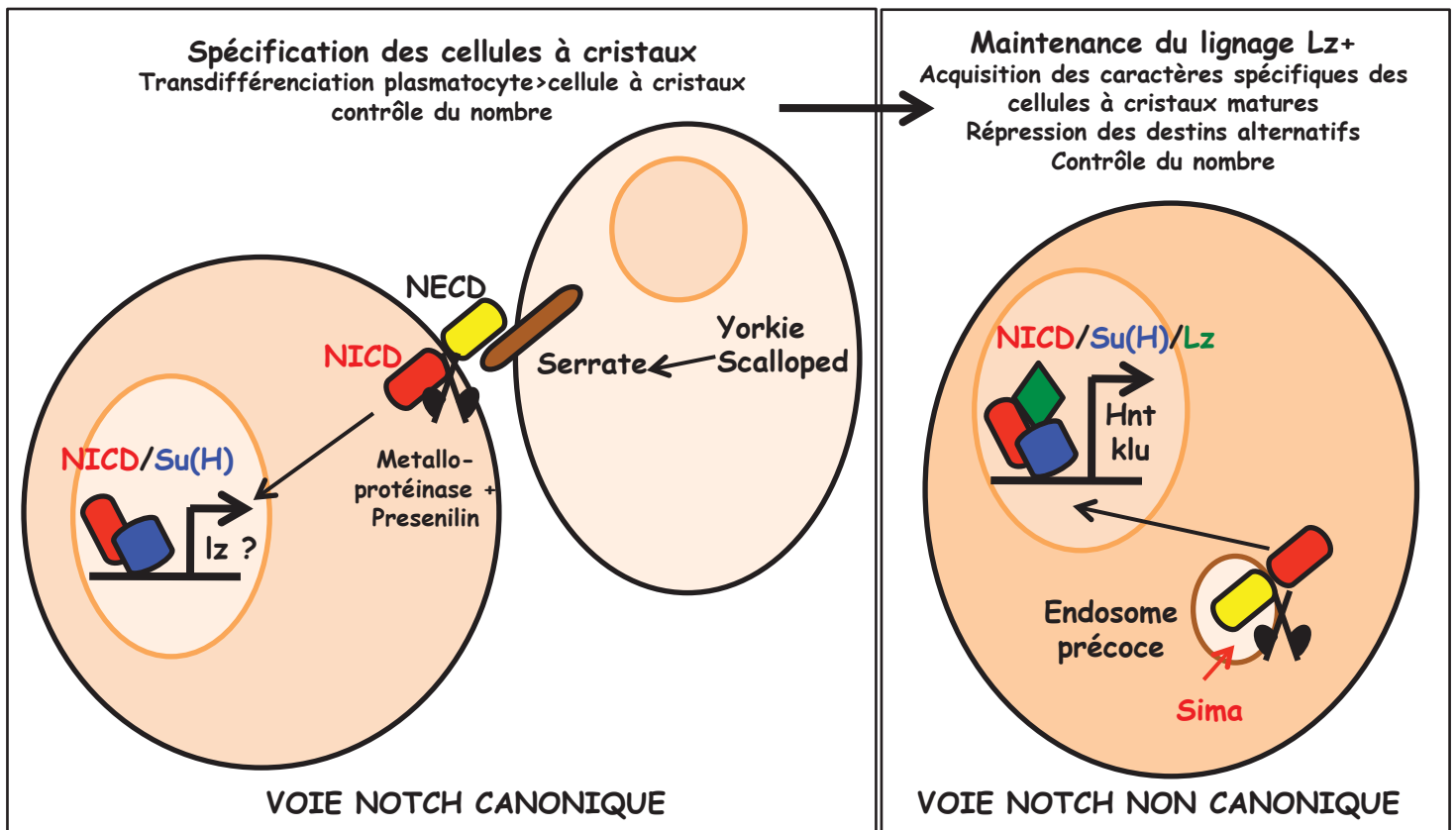
### **I.C.2.b. Contrôle moléculaire de la spécification des cellules à cristaux**

Etant donné que je me suis tout particulièrement intéressée aux cellules à cristaux durant ma thèse, je décrirai ci-dessous le contrôle de leur développement avec plus de détails que pour les plasmacytes ou les lamellocytes.

Au cours de l'hématopoïèse larvaire, au niveau de la glande lymphatique comme au niveau des hémocytes circulants, l'expression de LZ est nécessaire et suffisante à la spécification des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000). Comme dans l'embryon, LZ coopère avec le facteur pan-hématopoïétique SRP pour induire l'expression de marqueurs de différenciation des cellules à cristaux tels que les prophénoloxidasés PPO1/Bc et PPO2/PO45 (Ferjoux et al., 2007; Fossett et al., 2003).

De plus, il a été démontré qu'au cours de l'hématopoïèse larvaire l'induction du destin des cellules à cristaux est dépendante de la voie de signalisation Notch aussi bien dans les cellules circulantes que dans la glande lymphatique (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003; Mukherjee et al., 2011). Un premier rôle de la voie Notch passe par une activation canonique de cette voie par son ligand Serrate (Ser) et requiert le facteur de transcription Suppressor of Hairless (Su(H)). Ainsi, la perte de fonction de *N* (utilisation d'un allèle thermosensible ou surexpression d'une forme dominante négative de *N*), *Su(H)* ou *Ser* entraîne une diminution du nombre de cellules à cristaux alors que la surexpression de *Ser* ou d'une forme constitutivement activée de *N* (*Nintra*) induit une augmentation de leur nombre (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003). Les travaux de Lebestky *et al.*, (2003) montrent que la voie Notch agit en amont de *lz* pour induire son expression dans les précurseurs de cellules à cristaux.

Dans la glande lymphatique, l'étude de la voie Notch a aussi conduit à l'identification du PSC caractérisé alors par l'expression spécifique de *Ser* (Lebestky et al., 2003). Il a été initialement proposé que le PSC agisse comme un « centre de signalisation » nécessaire à la spécification des cellules adjacentes en cellules à cristaux. Cependant, ce modèle s'est avéré inexact : le PSC n'est pas requis pour la différenciation des cellules à cristaux mais d'autres cellules exprimant également *Ser* localisées dans la zone corticale à proximité des cellules *Lz+* seraient responsables du signal induisant le développement des cellules à cristaux



**Figure 11 : Représentation schématique du rôle de la voie de signalisation Notch au cours de l'hématopoïèse larvaire.**

La liaison du ligand serrate au domaine extra-cellulaire du recepteur transmembranaire Notch (NECD) entraîne le clivage de Notch et la libération de son domaine intra-cellulaire (NICD) qui va alors être transloqué dans le noyau où il va avec interagir avec suppressor of Hairless (Su(H)) pour activer (directement ou indirectement) la transcription de Lozenge (Lz). L'activation canonique de la voie Notch permet ainsi la spécification des cellules à cristaux larvaires à partir de progéniteurs ou de plasmacytes ainsi que le contrôle de leur nombre. L'activation non canonique de la voie Notch fait quant à elle intervenir Sima. Ce facteur de réponse à l'hypoxie stabilise Notch dans les endosomes précoces, favorise son clivage par la presenilin et sa translocation dans le noyau où il va, en coopération avec Lozenge (Lz) et suppressor of Hairless (Su(H)), activer la transcription de ses gènes cibles comme hindsight (hnt) et klumpfuss (klu). Cette activation de la voie Notch indépendamment du ligand permet la maintenance du lignage Lz+.

(Crozatier et al., 2004) (**figure 11A**). Une étude récente a conforté ce modèle en démontrant que l'expression de Yorkie et Scalloped, deux composants de la voie Hippo, promeuvent l'expression de Ser dans ces cellules de la zone corticale et sont requis pour la spécification des cellules adjacentes en cellules à cristaux (Ferguson et Martinez-Agosto, 2014a; Ferguson et Martinez-Agosto, 2014b). Une étude publiée en parallèle suggère elle que la voie Hippo contrôle le développement des cellules à cristaux à la fois de façon non autonome via la voie Notch et de façon autonome en activant directement la transcription de *lz* (Milton et al., 2014). De plus, l'identification de cibles directes de N/Su(H) en culture cellulaire a conduit à mettre en évidence que N/Su(H) coopère avec LZ dans les cellules à cristaux pour activer la transcription de certains gènes tels que *hindsight*, qui est impliqué dans l'endoréplication des cellules à cristaux, et *klumpfuss* qui réprime le destin alternatif (Terriente-Felix et al., 2013). Il semble donc que la voie Notch canonique agisse à différents niveaux dans le développement des cellules à cristaux de la glande lymphatique : d'une part elle induit l'expression de LZ et d'autre part elle coopère avec ce dernier pour verrouiller le destin cellule à cristaux. De la même façon, on notera que l'expression de RUNX1 dans les CSH est induite par Notch1 chez le poisson-zèbre (Burns et al., 2005), que Notch1 et RUNX coopèrent dans le spécification des lymphocytes T (Guo et al., 2008) et que CSL (l'orthologue de Su(H)) semble coopérer avec RUNX1 pour réguler la transcription dans des cellules de leucémies lymphoblastiques T (Wang et al., 2011a), suggérant une conservation fonctionnelle des liens entre voie Notch et facteurs RUNX dans la régulation de l'hématopoïèse.

Une activation non canonique de la voie Notch contrôle également le développement des cellules à cristaux. Cette voie cellulaire autonome et indépendante du ligand Ser (ou Delta) mais nécessite N, Su(H) et le facteur Sima, l'orthologue de Hif1 $\alpha$ , un facteur clé de la réponse à l'hypoxie, qui est exprimé à des niveaux élevés dans les cellules à cristaux même en condition de normoxie. Sima semble stabiliser l'internalisation de N dans des endosomes précoces et son clivage par la présiniline indépendamment de son ligand ce qui permettrait l'expansion des précurseurs Lz<sup>+</sup> et leur différenciation en cellules à cristaux matures (Mukherjee et al., 2011) (**figure 11B**). Ainsi, une baisse d'oxygène dans l'environnement est suffisante pour stabiliser d'avantage Sima et donc Notch et induire une augmentation du nombre de cellules à cristaux. De façon intéressante, une régulation similaire de la voie Notch par l'hypoxie et Hif-1 $\alpha$  a été mise en évidence chez les mammifères notamment lors de la différenciation myogénique et dans le cancer du sein (Gustafsson et al., 2005; Villa et al., 2014).



Par ailleurs, en absence d'Asrij, une protéine conservée impliquée dans l'endocytose, la relocalisation de N dans les endosomes précoces coïncide avec une augmentation drastique du nombre de cellules à cristaux dans la glande lymphatique. Ce phénotype suggère donc qu'Asrij pourrait intervenir dans la restriction du nombre de cellules à cristaux en contrôlant le trafic intracellulaire de N (Kulkarni et al., 2011).

Il est également intéressant de noter ici que, bien que la perte de fonction zygotique de *N* induise une diminution de leur nombre dans l'embryon (Lebestky et al., 2003), des analyse clonales et de surexpression ont permis de montrer que la voie Notch n'est pas requise ni suffisante pour la spécification des cellules à cristaux embryonnaires (Bataillé et al., 2005). A l'inverse, les résultats récemment obtenus pointent un rôle de cette voie de signalisation au cours de la différenciation des cellules à cristaux chez la *Drosophile* adulte (Ghosh et al., 2015).

Enfin, il a récemment été montré que, dans les îlots sessiles, les cellules à cristaux sont produites par transdifférenciation des plasmacytes en réponse à l'activation de la voie Ser/N (Leitão et Sucena, 2015). Ce processus de transdifférenciation ne semble pas expliquer l'origine de toutes les cellules à cristaux : dans l'embryon ces cellules émergent à partir de cellules sanguines encore non différenciées en plasmacytes (Bataillé et al., 2005) et dans la glande lymphatique il semble que la séparation entre le lignage plasmacyte et cellules à cristaux ait lieu au cours du second stade larvaire, alors qu'aucun signe de différenciation n'est encore visible (Krzemien et al., 2010).

### **I.C.2.c. Contrôle moléculaire de la spécification des plasmacytes**

Bien que les plasmacytes représentent la population majoritaire d'hémocytes différenciés, les mécanismes contrôlant spécifiquement la formation ce lignage restent encore assez peu connus. Dans la glande lymphatique, la différenciation des plasmacytes requiert le récepteur PVR (Jung et al., 2005), l'homologue des récepteurs PDGFR et VEGFR des vertébrés. En effet, une analyse clonale a permis de mettre en évidence que des clones mutants pour *pvr* et générés dans la glande lymphatique au premier stade larvaire sont capables de générer des cellules à cristaux mais pas de cellules exprimant Pxn ou P1/NimC1 (deux marqueurs de plasmacytes) au troisième stade larvaire. De plus, il a été démontré que la différenciation des plasmacytes requiert l'activation de l'expression du facteur GATA Pnr par STAT92E dans la zone corticale (Minakhina et al., 2011). Au niveau des hémocytes

circulants, le nombre de plasmatocytes ainsi que leur état de différenciation (capacité de phagocytose) est quant à lui contrôlé par les facteurs de transcription de types Nf-kB Dif et Dorsal ainsi que par Myb (Davidson et al., 2005; Matova et Anderson, 2006).

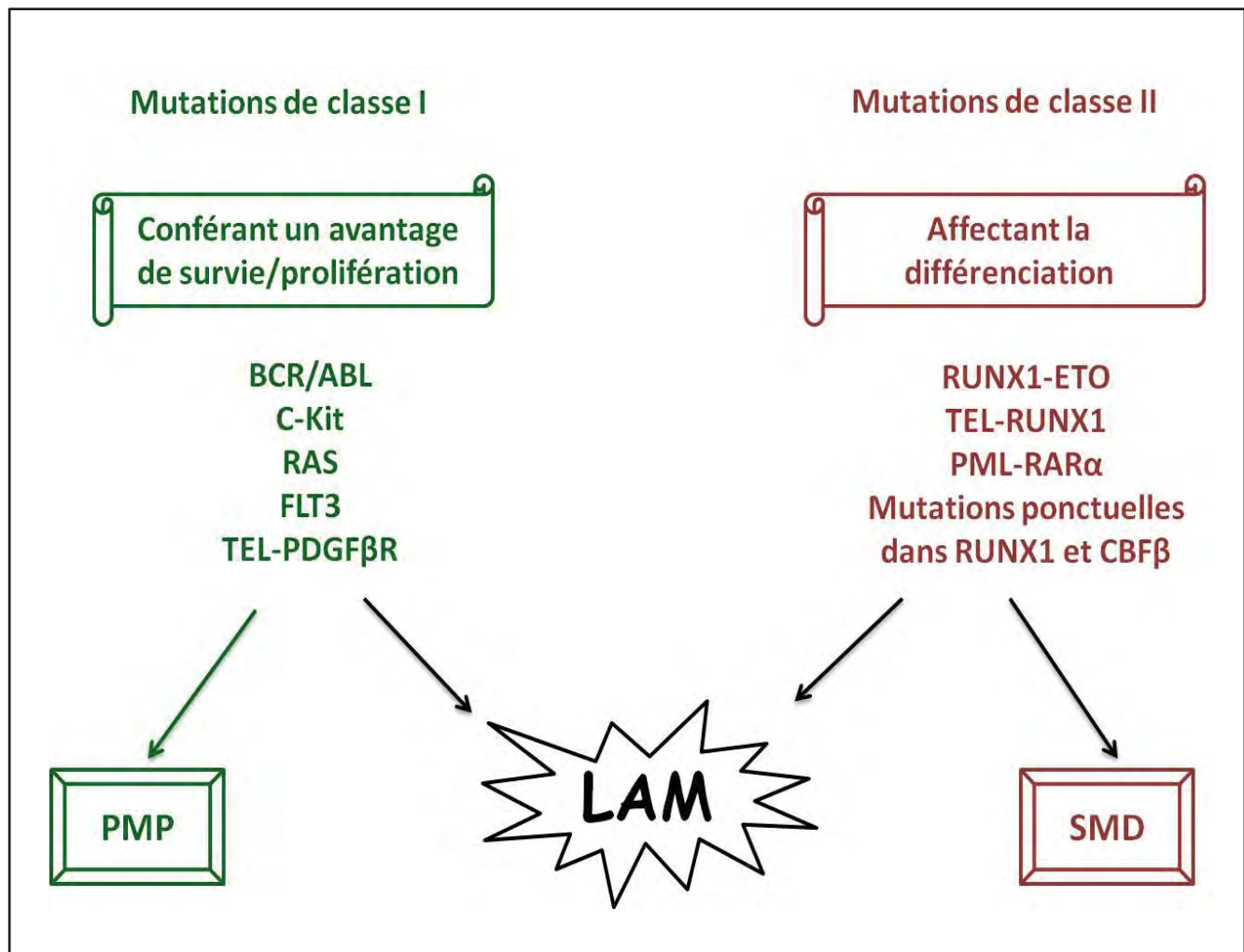
#### **I.C.2.d. Contrôle moléculaire de la spécification des lamellocytes**

Comme nous l'avons vu précédemment, les larves de *Drosophiles* ne produisent pas (ou très peu) de lamellocytes dans des conditions normales mais cette population est induite de façon massive en réponse à certains challenges immuns tels qu'une infection par *L. bouvardi*. Si de nombreuses mutations sont capable d'induire la production « spontanée » de lamellocytes, le rôle de la plupart de ces gènes dans l'apparition « physiologique » des lamellocytes n'a que rarement été étudié (Avet-Rochex et al., 2010). Néanmoins, il a été démontré que l'infection par *L. bouvardi* induit l'expression d'une forme non signalisatrice du récepteur de la voie JAK/STAT dans les prohémoctes de la glande lymphatique (Makki et al., 2010). Ce récepteur tronqué agit comme dominant négatif et permet l'extinction de la voie JAK/STAT dans la zone médullaire, un prérequis à la production des lamellocytes. La voie JAK/STAT semble néanmoins réactivée ultérieurement dans les hémocytes et elle est requise pour la différenciation des lamellocytes (Lanot et al., 2001; Qiu et al., 1998). De fait, il a été montré en 1995 qu'une forme constitutivement activée de la JAK kinase Hopscotch est suffisante pour induire une hyperprolifération des hémocytes et la différenciation de lamellocytes (Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995) suggérant que l'activation aberrante de cette voie pouvait être à l'origine de cancers du sang, ce qui a depuis était démontré chez l'Homme (Vainchenker et Constantinescu, 2013).

D'autre part, l'infection par *L. bouvardi* va activer la voie Toll/NF-kB et causer une augmentation du niveau de ROS dans le PSC qui va contribuer à la production de lamellocytes (Gueguen et al., 2013; Sinenko et al., 2012). En particulier, l'augmentation des ROS induit l'expression du ligand Spitz et l'activation de la voie EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) dans les hémocytes qui se différencient alors en lamellocytes (Sinenko et al., 2012).

Enfin, s'il a été initialement proposé que la voie Notch soit requise pour la production de lamellocytes (Duvic et al., 2002), des résultats plus récents montrent que ce n'est pas le cas et suggèrent plutôt que l'infection par *L. bouvardi* induit une diminution de l'activité de cette

voie qui favoriserait la production des lamellocytes au dépend de la production de cellules à cristaux (Small et al., 2014).



**Figure 12 : Coopération de deux types d'évènements dans le développement d'une LAM.**

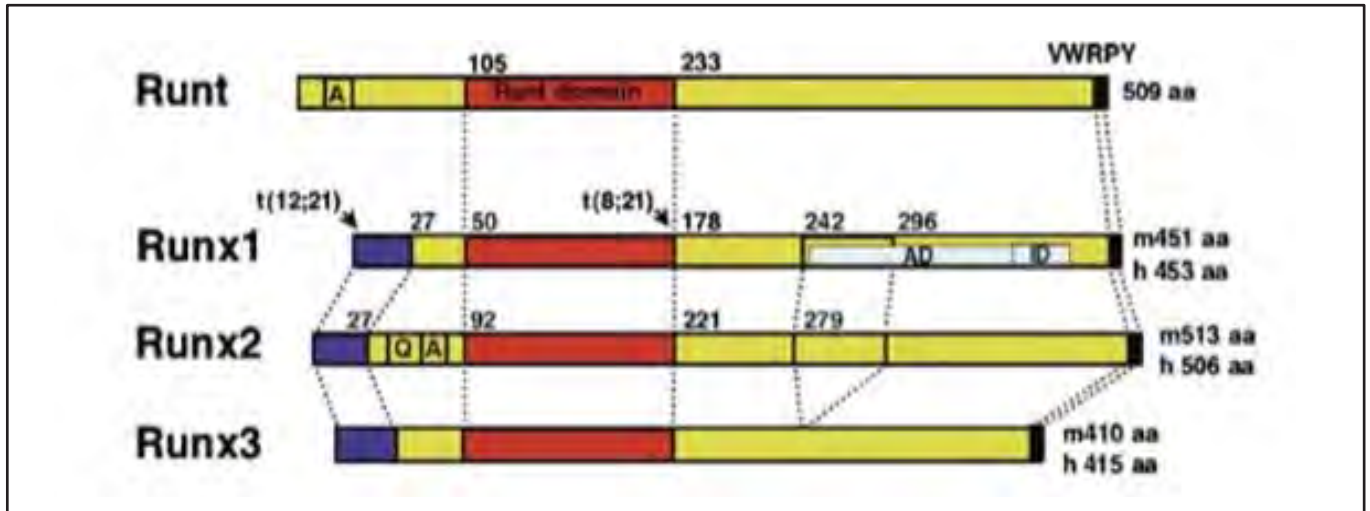
Les mutations de classe I confèrent un avantage prolifératif ou de survie aux cellules hématopoïétiques alors que les mutations de classe II affectent leur différenciation. Dans le cas où ces mutations sont présentes seules, elles peuvent induire des SMD (Syndromes Myélodysplasiques) ou des PMP (Pathologies Myéloprolifératives). (D'après Kelly et Gilliland 2002)

## **II. Les facteurs de transcription de la famille RUNX et l'hématopoïèse**

### **II.A. Les leucémies et l'identification de RUNX1**

Le premier lien entre les gènes de la famille RUNX et l'hématopoïèse a été établi il y a plus de 30 ans en recherchant la nature moléculaire d'une altération génique présente dans des cellules leucémiques. Les leucémies (du grec « *leukos* » qui signifie blanc et « *aima* » qui signifie sang) sont des cancers du sang qui se caractérisent par une prolifération anormale des globules blancs associée à une diminution de la production des globules rouges. Elles sont classées selon deux grands critères : leur rapidité d'évolution (chronique ou aigüe) et le type cellulaire qui est affecté (myéloïde ou lymphoïde).

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) représente près de 30% des cas de leucémie et se caractérise par la prolifération anormale de progéniteurs myéloïdes ayant perdu leur capacité à se différencier en cellule mature fonctionnelle. Au niveau moléculaire, des études cytogénétiques et plus récemment de séquençage, ont permis de mettre en évidence la présence d'altérations chromosomiques récurrentes associées au développement de LAM. Ces altérations (translocations réciproques, mutations ponctuelles, amplifications, délétions, inversions) en affectant la fonction de régulateurs hématopoïétiques cruciaux, vont altérer le processus de développement des cellules sanguines et permettre l'émergence de clones leucémiques. On considère généralement que le développement de LAM nécessite la coopération entre deux classes d'événements moléculaires (Kelly et Gilliland, 2002) (**figure 12**). La première classe d'événement (classe I) est représentée par des mutations qui confèrent aux cellules une capacité de prolifération ou de survie accrue alors que la seconde classe (classe II) est représentée par les mutations provoquant un blocage de la différenciation des cellules myéloïdes. Des mutations de classe I seule ou de classe II seule induisent respectivement des pathologies de types myéloproliférative ou myélodysplasique tandis que la combinaison des deux types de mutations induit le développement de LAM (Kelly et Gilliland, 2002). Dans ce modèle, les mutations de classe I affectent des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (C-KIT, FLT3, RAS...) alors que celles de classe II affectent des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la différenciation des cellules



**Figure 13 : Structure des facteurs de transcription de la famille RUNX.**

Les protéines de la famille RUNX contiennent un domaine de liaison à l'ADN dans leur partie N-terminale, nommé le domaine Runx et, à leur extrémité C-terminale, le motif conservé VWRPY, requis pour l'interaction avec des corépresseurs transcriptionnels. Deux autres domaines fonctionnels ont également été caractérisés : un domaine de transactivation et un domaine d'attachement à la matrice nucléaire (NMTS) (D'après Ito et al. 2004).

sanguines (RUNX1...). L'identification des gènes affectés par des remaniements chromosomiques dans des leucémies a donc non seulement permis de mieux comprendre les bases moléculaires de la leucémogénèse mais a également conduit à l'identification de nouveaux régulateurs du processus hématopoïétique normal. C'est notamment le cas de RUNX1 qui est a été identifié en clonant les points de cassure de la translocation t(8;21)(q22 ;q22) présente dans plus de 15% des cas de LAM chez l'Homme (Erickson et al., 1992; Miyoshi et al., 1991), mais aussi de MLF1 affecté dans la translocation t(3;5) et sur lequel je reviendrai dans le chapitre III.

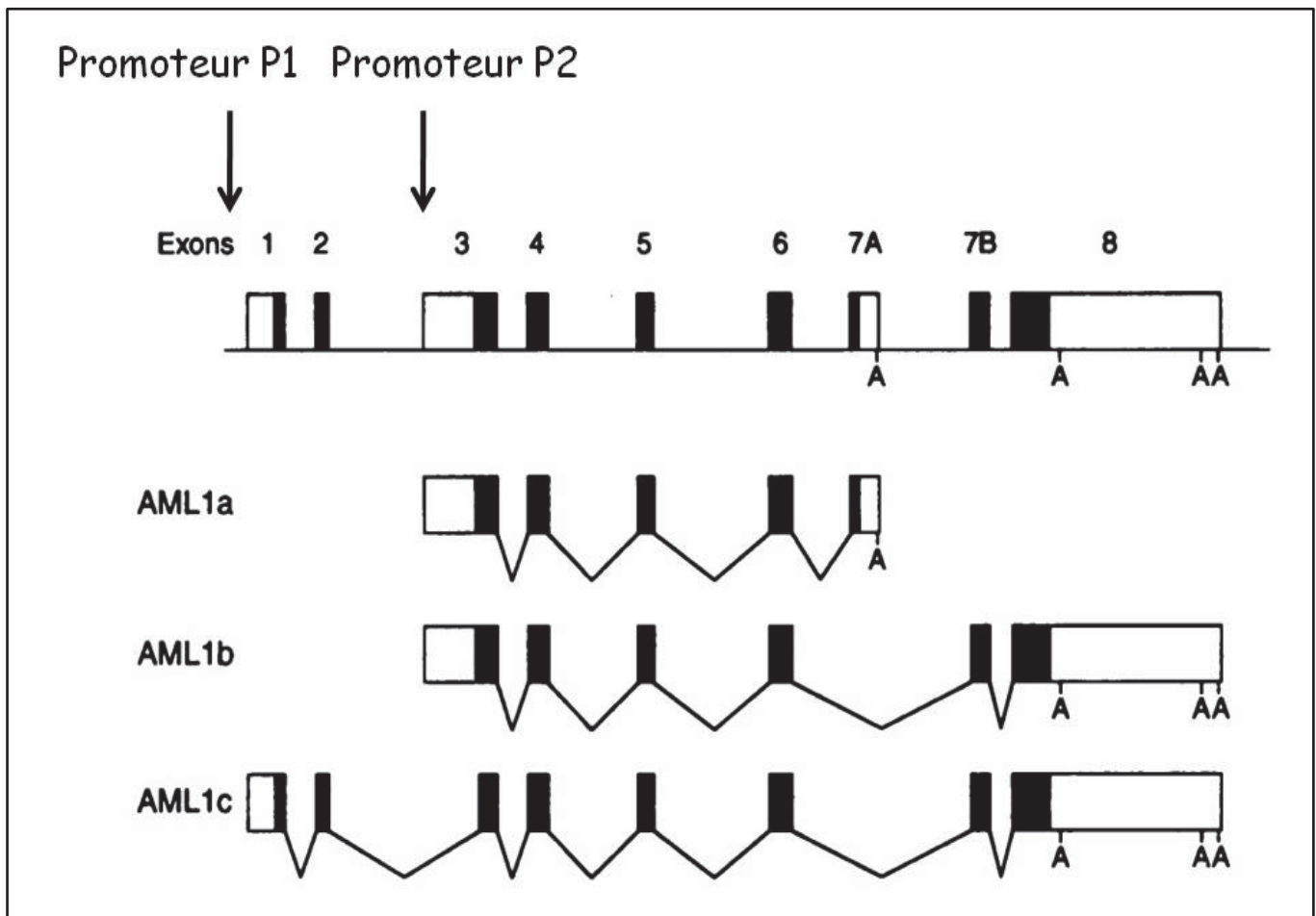
## **II.B. La famille RUNX : Description**

La famille des facteurs de transcription de type RUNX est une famille conservée au cours de l'évolution des métazoaires. Les facteurs RUNX se caractérisent par la présence d'un domaine spécifique de liaison à l'ADN de 128 acides aminés, le domaine Runt, en référence au membre fondateur de cette famille, le gène *runt* de la Drosophile. Ce domaine est responsable d'une part de la liaison à l'ADN au niveau de la séquence consensus TGYGGTY et d'autre part de l'hétérodimérisation avec le facteur CBF $\beta$  (Core Binding Factor  $\beta$ ) qui est essentielle pour augmenter l'affinité de liaison à l'ADN des facteurs RUNX (Ito et al., 2015). Bien que la séquence C-terminale des RUNX soit moins conservée, elle contient presque toujours le motif VWRPY permettant le recrutement de corépresseurs transcriptionnels de la famille Groucho/TLE (Robertson et al., 2009) (**figure 13**).

### **II.B.1. La famille RUNX chez les mammifères**

Chez les mammifères et plus largement chez les vertébrés cette famille est composée de trois gènes, *RUNX1*, *RUNX2* et *RUNX3* qui sont des régulateurs clés de différents processus ontogéniques. *RUNX1* régule notamment la quiescence des cellules souches du follicule pileux (Osorio et al., 2008; Osorio et al., 2011) et le développement de différents types de neurones (Lou et al., 2013) mais il est surtout connu pour ses fonctions lors de l'hématopoïèse, sur lesquelles je reviendrai au paragraphe II.B. *RUNX2* intervient quant à lui lors de la différenciation des ostéoblastes et la vascularisation osseuse (Komori, 2010a; Komori, 2010b) et enfin, *RUNX3* agit lors du développement des cellules T (Woolf et al.,





**Figure 14 : Représentation de l'organisation génomique et des transcrits alternatifs de *RUNX1/AML1*.**

Les positions des deux promoteurs (P1 et P2) sont indiquées par des flèches. Les boîtes noires représentent les régions codantes tandis que les boîtes blanches sont des régions non traduites 5' et 3'. Les positions des signaux de poly-adénylation sont indiquées par des A. (D'après Miyoshi et al., 2005).

2003), du système nerveux (Inoue et al., 2008) et des cellules gastriques endothéliales (Li et al., 2002).

Au niveau moléculaire, les trois gènes RUNX possèdent deux promoteurs alternatifs (distal P1 et proximal P2) générant, pour *RUNX1*, au moins trois transcrits (1a, 1b et 1c) qui diffèrent par leur région 5'UTR (Untranslated Region) et par leur région codante N-terminale (Miyoshi et al., 1995) (**Figure 14**). Alors que les formes b et c possèdent toutes deux un rôle activateur de la transcription des gènes cibles de RUNX1, il est proposé par Miyoshi et ses collaborateurs que l'isoforme 1a qui ne contient pas la région C-terminale portant des domaines de transactivation agisse comme un inhibiteur compétitif des deux autres isoformes. Une étude remet cependant en cause ce modèle en montrant que RUNX1a permettrait de promouvoir l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (Tsuzuki et Seto, 2012). A l'heure actuelle, le rôle respectif des différentes isoformes dans la régulation de la fonction de *RUNX1* reste largement inconnu (Real et al., 2013).

### **II.B.2. La famille RUNX chez la Drosophile**

Chez la Drosophile il existe 4 gènes de type RUNX : *lozenge*, *runt*, *RunxA* et *RunxB* (Rennert et al., 2003). Le membre fondateur de cette famille, *runt*, a été découvert lors d'un crible génétique visant à identifier les acteurs impliqués dans la segmentation de l'embryon de Drosophile (Gergen et Butler, 1988). Depuis, il a également été impliqué lors de la détermination du sexe ainsi qu'au cours de la neurogenèse (Duffy et Gergen, 1991; Duffy et al., 1991). Concernant *RunxA* et *RunxB*, à l'heure actuelle leurs patrons d'expression ainsi que leurs fonctions sont inconnus. *lz* a quant à lui initialement été identifié pour sa fonction au cours du développement de l'œil : les premier allèles mutants de *lz* qui affectent la forme de l'œil de la Drosophile ont été isolés par Morgan, Bridges et Sturtevant dans les années 1920. En effet, LZ régule positivement la transcription d'un grand nombre de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de trois des huit neurones photorécepteurs composant les ommatidies (Daga et al., 1996). Dans l'œil, plus précisément dans les cellules coniques et pigmentaires, LZ est également capable d'activer la transcription de *klumpfuss* et *argos* entraînant une diminution de l'activité EGFR et une entrée en apoptose des cellules excédentaires de l'œil (Wildonger et al., 2005). Il est à noter que dans ce contexte LZ peut également avoir un rôle de répresseur de la transcription (Canon et Banerjee, 2000). En plus de son rôle au cours du développement de l'œil, LZ est connu pour avoir un rôle au cours du

développement des gonades, des antennes, des tarsi, ainsi qu'au cours de l'hématopoïèse (Canon et Banerjee, 2000), rôle sur lequel je reviendrai au paragraphe II.B.

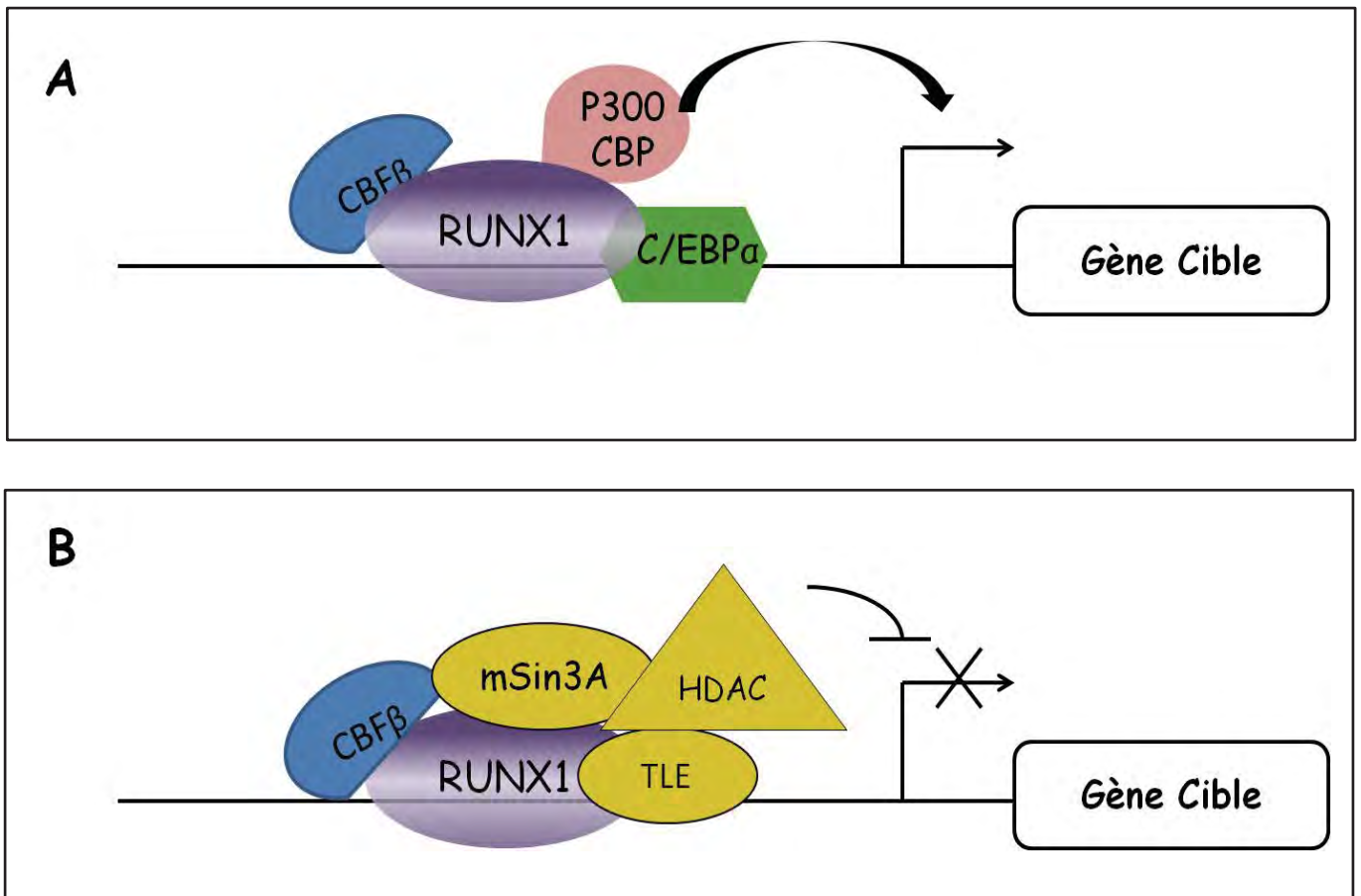
Au niveau moléculaire LZ possède une forte identité de séquence avec les protéines RUNX au niveau du domaine de liaison à l'ADN ; ainsi LZ et la protéine humaine RUNX1 présentent 71% d'identité au niveau du domaine Runt. Chez la Drosophile, *lz* est localisé sur le chromosome X et code pour deux isoformes issues d'épissage alternatif : LZ (84.7 kDa) et LZΔ5 (72.2 kDa). LZΔ5 est issue d'un ARNm dépourvu de l'exon 5 qui code le domaine d'interaction avec le facteur ETS Pointed. Dans l'œil, l'équilibre entre ces deux isoformes est régulé par la signalisation Ras et pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la différenciation des photorécepteurs (Daga et al., 1996).

## **II.C. Les facteurs RUNX au cours de l'hématopoïèse**

### **II.C.1. Rôle des facteurs de type RUNX au cours de l'hématopoïèse**

#### **II.C.1.a. Rôles de RUNX1 chez les mammifères**

Chez les mammifères les trois membres de la famille RUNX sont exprimés dans des cellules sanguines et RUNX1 joue un rôle particulièrement important à différentes étapes du processus hématopoïétique, de l'émergence des cellules souches hématopoïétiques à leur différenciation en lymphocyte ou en mégacaryocytes. La caractérisation des souris déficientes pour *runx1* a permis de mettre en évidence son rôle essentiel dans l'apparition des cellules souches hématopoïétiques. En effet, ces souris présentent une érythropoïèse primitive normale au sein du sac vitellin mais ne possèdent pas de progéniteurs hématopoïétiques définitif au sein du foie fœtal (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996). Les cellules présentes dans les tissus hématopoïétiques comme le sac vitellin ou le foie fœtal ne sont pas capables de se différencier en cellules hématopoïétiques matures et les animaux meurent d'hémorragies vers 13 jours de développement. En fait, *runx1* est essentiel à l'émergence des CSH au niveau de l'AGM (Chen et al., 2009; Lancrin et al., 2009). Chez la souris adulte, l'utilisation du système CRE/loxP a permis de montrer que *runx1* n'est plus requis dans les CSH une fois qu'elles sont spécifiées et n'est pas essentiel pour l'hématopoïèse adulte. Il participe néanmoins à la différenciation des mégacaryocytes et au développement des lymphocytes T et B chez la souris adulte (Growney et al., 2005; Ichikawa et al., 2004; Kitoh et al., 2009). Le dosage de



**Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme de régulation de la transcription par RUNX1.**

RUNX1 se lie à ses gènes cibles grâce à son domaine de liaison à l'ADN et se dimérise avec CBFβ. **(A)** Il peut agir comme activateur en interagissant avec un ensemble de coactivateurs transcriptionnels (ex : CBP, p300) et d'autres facteurs de transcription lignages spécifiques (ex : C/EBPα). **(B)** RUNX1 peut également agir comme répresseur transcriptionnel grâce au recrutement de corépresseurs tels que HDAC, TLE et mSin3A (D'après de Lutterbach et al., 2000).

*runx1* joue également un rôle important dans l'hématopoïèse : chez des souris hétérozygotes mutantes pour *runx1* les CSH apparaissent plus précocement dans la région AGM et sont plus nombreuses dans l'embryon mais elles sont moins capables de se maintenir à long terme chez la souris adulte (Cai et al., 2000; Sun et Downing, 2004).

### **II.C.1.b. Rôle de LZ chez la Drosophile**

Chez la Drosophile, des allèles mutants de *lz* sont connus depuis longtemps pour causer une absence d'activité phénoloxidase dans l'hémolymph ainsi que pour supprimer la mutation *Black cell*, caractérisée par la présence de spots noirs correspondant aux cellules à cristaux ayant mélanisées (Peeples et al., 1969a; Peeples et al., 1969b; Rizki et Rizki, 1981; Rizki et al., 1985). Par la suite il a été démontré que LZ est exprimé dans le lignage des cellules à cristaux embryonnaires et larvaires où il est requis pour leur différenciation. En effet, les drosophiles mutantes pour *lz* ne possèdent pas de cellules à cristaux embryonnaires et larvaires (Lebestky et al., 2000). De plus, l'utilisation d'un allèle thermosensible de *lz* a permis de déterminer que son expression est requise de manière continue pour maintenir le destin cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000).

## **II.C.2. Mode d'action des facteurs de type RUNX au cours de l'hématopoïèse**

### **II.C.2.a. Mode d'action de RUNX1 chez les mammifères**

Au niveau moléculaire RUNX1 agit comme un régulateur clé de la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le maintien de la différenciation hématopoïétique. Il est capable de réprimer ou d'activer la transcription selon les contextes et il peut jouer un rôle de chef d'orchestre permettant l'assemblage de complexes multiprotéiques au niveau des éléments cis-régulateurs de ses gènes cibles (**figure 15**). Ainsi, il est capable de recruter des coactivateurs transcriptionnels tels que les histones acétyl transférase CBP/p300 (Lutterbach et Hiebert, 2000) et MOZ/MORF (Kitabayashi et al., 2001; Pelletier et al., 2002) ou des corépresseurs tels que les membres de la famille TLE (Transducin-Like Enhancer of split1)(Lutterbach et Hiebert, 2000), l'histone méthyltransférase SUV39H1 (Reed-Inderbitzin et al., 2006) ou encore mSin3A et mSin3B (Lutterbach et Hiebert, 2000). De plus, RUNX1 agit en synergie avec différents facteurs de transcription comme C/EBPalpha et le facteur de

type ETS PU.1 lors du développement des cellules myéloïdes (Petrovick et al., 1998; Zhang et al., 1996) mais aussi avec les facteurs de type GATA puisque RUNX1 coopère avec GATA2 dans les CSH (Wilson *et al.*, 2010), avec GATA1 au cours de la différenciation des mégacaryocytes (Elagib et al., 2003; Pencovich et al., 2011; Tijssen et al., 2011) et avec GATA3 dans la différenciation des lymphocytes T (Collins et al., 2009).

### **II.C.2.b. Mode d'action de LZ chez la Drosophile**

Comme nous l'avons vu précédemment, LZ interagit physiquement et fonctionnellement avec le facteur de transcription pan-hématopoïétique de type GATA SRP pour induire la transcription de gènes spécifiques des cellules à cristaux (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2003). L'étude des régions *cis*-régulatrices des gènes induits par ce complexe LZ/SRP a permis de montrer qu'ils contiennent fréquemment un module conservé de *D. melanogaster* à *D. yakuba* comportant au moins un site de fixation pour les facteurs GATA et un site de fixation pour les facteurs de type RUNX dans une orientation particulière l'un par rapport à l'autre (Ferjoux et al., 2007). L'utilisation de rapporteurs transgéniques a aussi permis de montrer pour certains d'entre eux que ces deux sites sont requis pour la transactivation par LZ/SRP *in vivo* (Ferjoux et al., 2007; Gajewski et al., 2007; Muratoglu et al., 2007). Parmi les cibles de ce complexe on retrouve notamment *lz* lui-même, les gènes codant les prophénoloxidases ainsi que *mlf* sur lequel je reviendrai dans le chapitre III.

Plus récemment l'identification des gènes cibles de Notch/Su(H) dans les cellules Kc167 a permis de montrer que Notch/Su(H) coopère avec LZ pour activer la transcription de gènes impliqués dans des processus spécifiques des cellules à cristaux, comme *hindsight* (*hnt*) impliqué dans l'endoréplication, et pour réprimer (indirectement) les gènes du destin alternatif (Terriente-Felix et al., 2013). LZ ne semble pas interagir physiquement avec Su(H) mais sa fixation sur les séquences régulatrices des gènes cibles de Notch/Su(H) est requise pour le recrutement de Su(H) et leur activation dans les cellules à cristaux. Là encore, des sites de fixation pour un facteur GATA (potentiellement SRP) sont importants pour l'activation de ces cibles (Terriente-Felix et al., 2013).

### **II.D. Régulations post-traductionnelles de l'activité des facteurs de type RUNX**

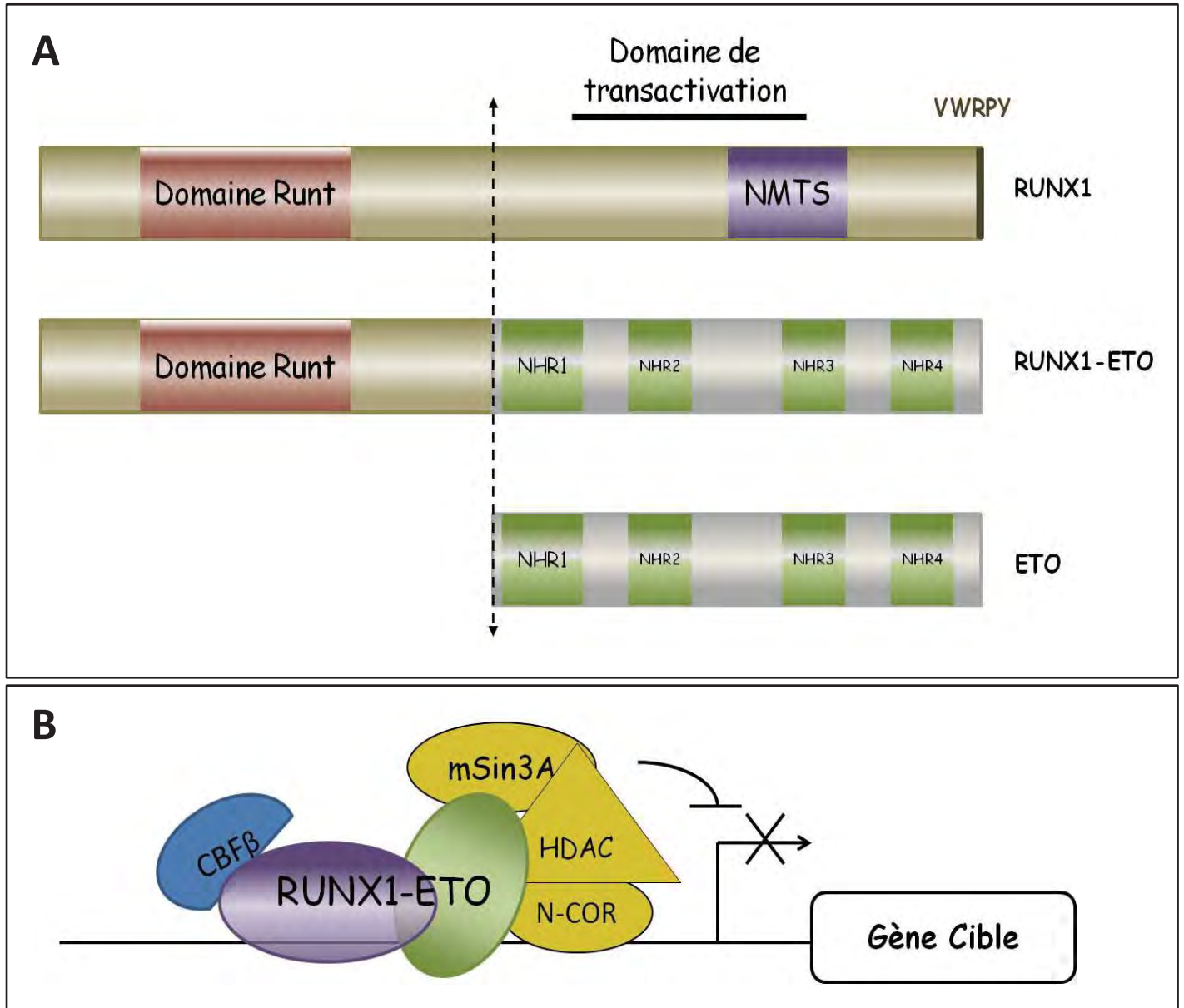
En plus de la régulation de leur expression au niveau transcriptionnel, un aspect important de la régulation des RUNX intervient au niveau post-traductionnel. En particulier, il a été montré chez les mammifères que RUNX1 est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation, la phosphorylation, la méthylation ou encore l'acétylation, qui permettent de réguler l'activité de ce dernier en modulant son interaction avec ses partenaires ou en agissant sur sa stabilité/dégradation.

Ainsi, il a été montré que la stimulation par des cytokines telles que la thrombopoïétine peut induire la phosphorylation du domaine de transactivation de RUNX1 par les kinases ERK1/2 (Hamelin et al., 2006). Cette phosphorylation augmente l'activité transcriptionnelle de RUNX1 en facilitant d'une part son association avec le coactivateur p300 et d'autre part sa dissociation avec le corépresseur mSin3A (Imai et al., 2004). De façon similaire, la méthylation de RUNX1 par l'arginine méthyltransférase PRMT1 provoque une diminution de son interaction avec le corépresseur mSin3A (Wang et al., 2009; Zhao et al., 2008). Au contraire, la phosphorylation de RUNX1 par une kinase de la famille Src inhibe son interaction avec GATA-1 et interfère avec la différenciation des mégacaryocytes (Huang et al., 2012). (Biggs et al., 2006)

D'autre part, la stabilité de RUNX1 est régulée par des modifications post-traductionnelles. Notamment, il a été démontré que l'ubiquitinylation de RUNX1 favorise sa dégradation par le protéasome et que l'interaction de RUNX1 avec CBF $\beta$  empêche cette ubiquitinylation et donc inhibe sa dégradation (Huang et al., 2001). La phosphorylation de RUNX1 est d'ailleurs aussi impliquée dans le contrôle de sa dégradation : sa phosphorylation par ERK1/2 peut favoriser son adressage au protéasome (Biggs et al., 2006) et celle médiée par la CDK Cdc20 favorise sa dégradation par l'Anaphase Promoting Complex (APC/C) (Biggs et al., 2006). En lien avec cette dernière observation, il a été montré que le niveau de RUNX1 fluctue au cours du cycle cellulaire et qu'il chute à la transition M/G1 (Wang et al., 2007).

Chez la Drosophile, très peu de données existent sur une régulation post-traductionnelle de l'activité des RUNX et de LZ en particulier. L'activité de LZ est régulée positivement par MLF (Bras et al., 2012). Cette régulation de l'activité des RUNX semble d'ailleurs être une caractéristique conservée des facteurs MLF et je reviendrai plus en détails sur cet aspect au cours du prochain chapitre. Récemment, il a été montré que LZ est sumoylé par la E3 SUMO ligase PIAS, de même que les 3 protéines RUNX de mammifère, et que LZ et dPIAS interagissent génétiquement pour contrôler le développement de l'œil de la





**Figure 16 : Structure et mode d'action de la protéine de fusion RUNX1-ETO.**

(A) La protéine oncogénique RUNX1-ETO contient la partie N-terminale de RUNX1, comprenant le domaine de liaison à l'ADN Runt, fusionnée avec la quasi-totalité de la protéine ETO. NHR : Nervy Homology Region (Adaptée de Blyth et *al.* 2005). (B) Il a été proposé que RUNX1-ETO agisse comme un répresseur transcriptionnel des gènes cibles de RUNX1 en recrutant, via ETO, un complexe répresseur comprenant les facteurs mSin3A, HDAC et N-CoR (Elagib et al., 2006).

Drosophile (Kim et al., 2014). Cependant, les conséquences moléculaires de cette sumoylation sur l'activité de LZ n'ont pas été caractérisées. A ma connaissance rien d'autre n'a été publié concernant la régulation post-traductionnelle de LZ.

## **II.E. Facteurs RUNX et pathologies**

### **II.E.1. RUNX et pathologies chez l'homme**

Chez l'homme, *RUNX1* est l'un des gènes les plus fréquemment muté dans les hémopathies malignes. Parmi les nombreuses altérations génétiques sont retrouvées aussi bien des translocations chromosomiques que des mutations ponctuelles (somatiques ou familiales).

Le gène *RUNX1* est également connu sous le nom d'*AML1* (*Acute Myeloid Leukemia 1*) car il a été identifié lors du clonage des gènes affectés par la translocation t(8;21) associée au développement d'environ 15% des LAM chez l'homme (Erickson et al., 1992; Miyoshi et al., 1991). Cette translocation génère la protéine chimère RUNX1-ETO contenant les 177 acides aminés N-terminaux de RUNX1 (dont le domaine de liaison à l'ADN) fusionnés à la quasi-totalité de la protéine ETO, un corépresseur de la transcription (Lam et Zhang, 2012; Peterson et al., 2007) (**figure 16A**). Les études réalisées dans des lignées cellulaires dérivées de patients atteints de LAM t(8.21)+ (Kasumi-1 et SKNO-1) démontrent que l'expression de RUNX1-ETO est nécessaire pour la prolifération et le blocage de la différenciation de ces cellules (Martinez et al., 2004). Les études dans les modèles murins suggèrent quant à elles que la translocation t(8 ;21) agisse comme un événement initiateur mais que l'expression de RUNX1-ETO ne soit pas suffisante et donc que d'autres altérations génétiques (de classe I) soient nécessaires au développement de LAM (Schessl et al., 2005; Wang et al., 2011b). En accord avec ce modèle, chez l'homme, des mutations activatrices dans *c-KIT* ou *FLT3* sont fréquemment associées à la translocation t(8 ;21). Au niveau moléculaire, il a initialement été proposé que, via le recrutement de répresseurs transcriptionnels par la partie ETO, RUNX1-ETO agisse comme un antagoniste de RUNX1 (Elagib et Goldfarb, 2007; Matsuura et al., 2012) (**Figure 16B**). Il apparaît cependant que le mécanisme d'action de RUNX1-ETO soit plus complexe. En effet, RUNX1-ETO est également capable d'agir comme activateur de la transcription, ne régule l'expression que d'un sous-ensemble des cibles de RUNX1, et régule également des gènes qui ne sont pas des cibles de RUNX1 (Gardini et al., 2008; Okumura et al., 2008; Ptasinska et al., 2012).

Il a été montré que *RUNX1* est la cible de nombreux autres remaniements chromosomiques associés à des hémopathies malignes (De Braekeleer et al., 2009). Ces translocations sont presque toujours associées à des SMD et des LAM, une exception notable étant la translocation t(12 ;21) qui est présente dans près de 25% des leucémies aigües lymphoïdes B chez l'enfant. En lien avec le rôle central de *RUNX1* dans le développement normal ou cancéreux des cellules du lignage myéloïde, il est aussi intéressant de noter que des translocations affectant son partenaire CBF $\beta$  et interférant avec la fonction de *RUNX1* sont fréquemment retrouvées dans des LAM (Blyth et al., 2005).

En plus de ces translocations qui génèrent des protéines chimériques entre *RUNX1* et un autre facteur, des mutations ponctuelles somatiques dans *RUNX1* sont associées à 5 à 10% des LAM et des SMD (Blyth et al., 2005; Harada et Harada, 2009). Ces mutations affectent principalement le domaine runt ou le domaine de transactivation de *RUNX1*. Elles sont regroupées en trois catégories : 1) les mutations bi-alléliques (très rares) générant une protéine non fonctionnelle, 2) les mutations mono-alléliques générant des versions tronquées de *RUNX1* pouvant potentiellement agir comme dominant négatif et 3) les mutations mono-alléliques faux-sens dont le mécanisme d'action est plus énigmatique. D'autre part, des mutations familiales haplo-insuffisantes de *RUNX1* ont été identifiées dans une pathologie héréditaire très rare appelée FPD (Familial Platelet Disorder), pathologie caractérisée par une thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes) et associée à une prédisposition au développement de LAM (Michaud et al., 2002; Song et al., 1999). Ainsi, une diminution du niveau de *RUNX1* semble altérer le développement des cellules sanguines et pourrait favoriser l'émergence de cellules leucémiques chez l'Homme.

*RUNX2* et *RUNX3* sont également impliqués dans le développement de différentes pathologies. En particulier, des mutations monoalléliques entraînant une diminution du niveau d'expression de *RUNX2* sont responsables d'une pathologie osseuse, la dysplasie cléido-crâniennes chez l'homme (Cohen, 2013), alors que sa surexpression est associée au développement d'ostéosarcomes (Thomas et Kansara, 2006). De plus l'augmentation du niveau d'expression de *RUNX2* est associée au développement de lymphome des cellules T chez la souris (Cameron et al., 2003). Concernant *RUNX3*, il a été montré que son inactivation chez la souris cause des cancers gastriques et, l'hyperméthylation de son promoteur ainsi que des mutations monoalléliques ont été associées au développement de cancers chez l'homme (Li et al., 2002). Cependant, ces conclusions font débat (Lotem et al., 2015).

L'ensemble de ces données montre qu'une régulation fine du niveau d'expression ou de l'activité des RUNX est cruciale pour un développement correct.

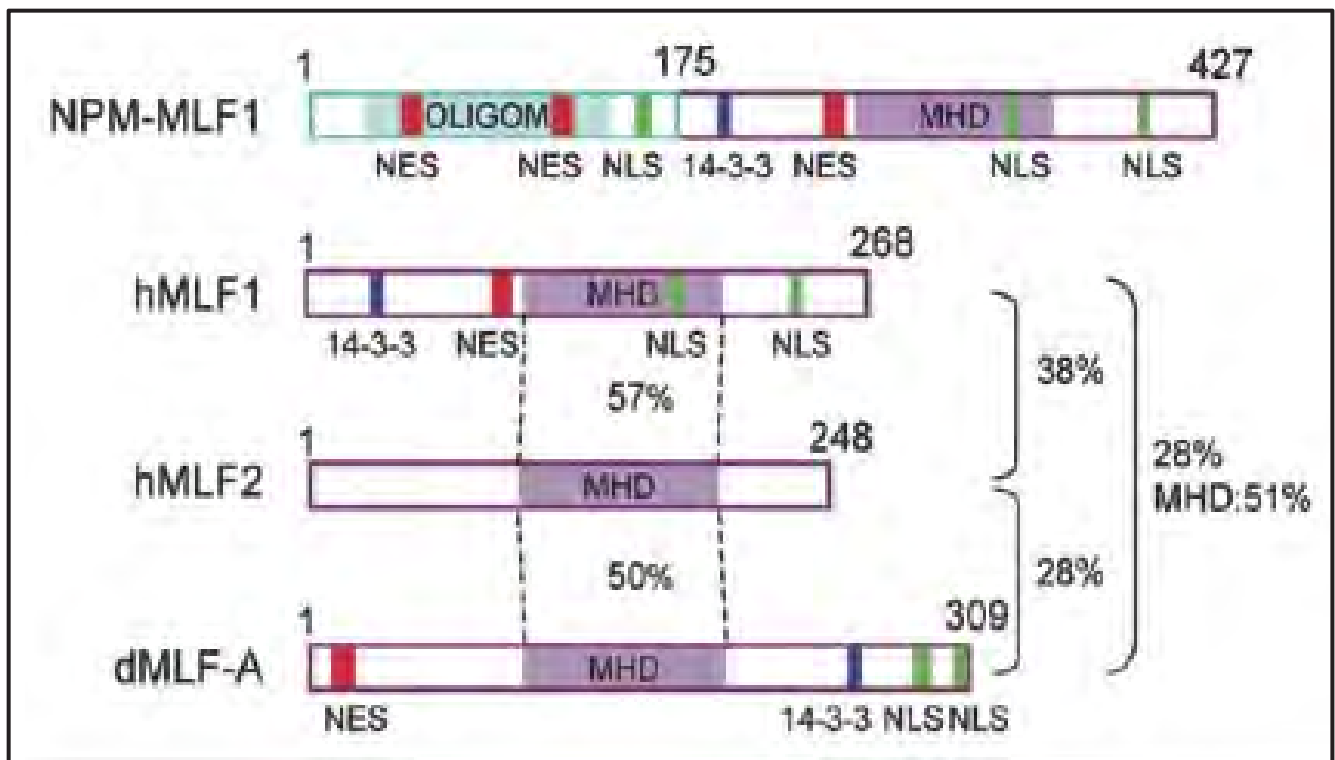
### **II.E.2. La Drosophile comme modèle pour l'étude de RUNX1-ETO**

Alors que de nombreuses études ont été menées pour caractériser le mode d'action de RUNX1-ETO en culture cellulaire ou dans des modèles murins, il reste difficile d'identifier les gènes qui participent à son activité oncogénique. Les outils génétiques disponibles chez la Drosophile et les parallèles qui existent entre LZ et RUNX1 ont incité certaines équipes à utiliser la Drosophile pour tenter de mieux comprendre le mode d'action de RUNX1-ETO. Une première étude réalisée par Wildonger et Mann (2005) a ainsi montré que RUNX1-ETO peut interférer avec la fonction de *lz* dans l'œil et suggérait que RUNX1-ETO agisse comme un répresseur constitutif des gènes cible de LZ dans cet organe (Wildonger et Mann, 2005).

Par la suite, au laboratoire, notre équipe a quant à elle initié la caractérisation du mode d'action de RUNX1-ETO lors du processus hématopoïétique chez la Drosophile. Les résultats obtenus montrent que l'expression de cette protéine leucémogène dans le domaine d'expression de LZ induit d'une part, une létalité 100% pénétrante au stade de pupes et, d'autre part, des phénotypes de type "pré-leucémiques" chez la larve. En effet, l'expression de RUNX1-ETO dans les cellules sanguines RUNX+ (LZ+) induit chez la larve une accumulation de progéniteurs exprimant LZ mais bloqués dans leur différenciation en cellules à cristaux (Osman et al., 2009). De plus, grâce à un crible génétique par RNAi *in vivo*, plusieurs gènes requis pour l'activité « leucémogène » de RUNX1-ETO chez la Drosophile ont pu être identifiés (Osman et al., 2009). La caractérisation de certains d'entre eux a montré que leurs homologues étaient aussi requis pour l'activité de RUNX1-ETO dans des cellules leucémiques humaines (Bras et al., 2012; Breig et al., 2014; Osman et al., 2009); montrant ainsi que la Drosophile peut permettre d'identifier des gènes importants pour l'activité de RUNX1-ETO.

Enfin, l'équipe du Dr U. Banerjee a également utilisé la Drosophile pour étudier le rôle de RUNX1-ETO au cours de l'hématopoïèse (Sinenko et al., 2010). Dans cette étude l'expression de RUNX1-ETO a été induite dans la quasi-totalité des hémocytes circulants et de la glande lymphatique. Cette expression induit une forte augmentation du nombre de progéniteurs hématopoïétiques. La réalisation d'un crible génétique a là aussi permis d'identifier des modulateurs des phénotypes causés par RUNX1-ETO qui pourraient être impliqués dans les LAM chez l'Homme.

Ainsi, ces données apportent un exemple supplémentaire de l'intérêt de la *Drosophile* comme modèle pour l'étude des fonctions normales et pathologiques des facteurs de type RUNX au cours de l'hématopoïèse.



**Figure 17 : Représentation schématique des membres de la famille MLF chez l'Homme et la Drosophile.**

La protéine de fusion NPM-MLF1 produite par la translocation t(3;5) est composée de la région N-terminale de NPM1 (acide aminés 1 à 175) fusionnée à la quasi-totalité de MLF1 (acides aminés 16 à 268). Chez la Drosophile, il existe quatre isoformes de MLF produites par épissage alternatif et qui diffèrent par leurs extrémités N ou C-terminales. La plus étudiée, dMLF-A, est représentée ici. Les différents domaines identifiés dans ces protéines sont indiqués : NLS: nuclear localization signal, OLIGOM: NPM1 oligomerization domain, 14-3-3 : motif consensus de liaison aux protéines 14-3-3 et MHD: MLF homology domain. Le pourcentage d'identité entre les protéines de la famille MLF ou de leur domaine d'homologie sont également indiqués. (D'après Gobert et al., 2012).

### **III. Les facteurs Myeloid Leukemia Factor, MLF**

Les facteurs MLF (Myeloid Leukemia Factor) forment une famille de protéines conservée au cours de l'évolution et dont le membre fondateur est impliqué dans le développement de LAM et de SMD chez l'homme (Yoneda-Kato et al., 1996). Cependant leurs fonctions et leur mode d'action demeurent très peu caractérisés.

#### **III.A. La famille MLF : Une famille conservée au cours de l'évolution**

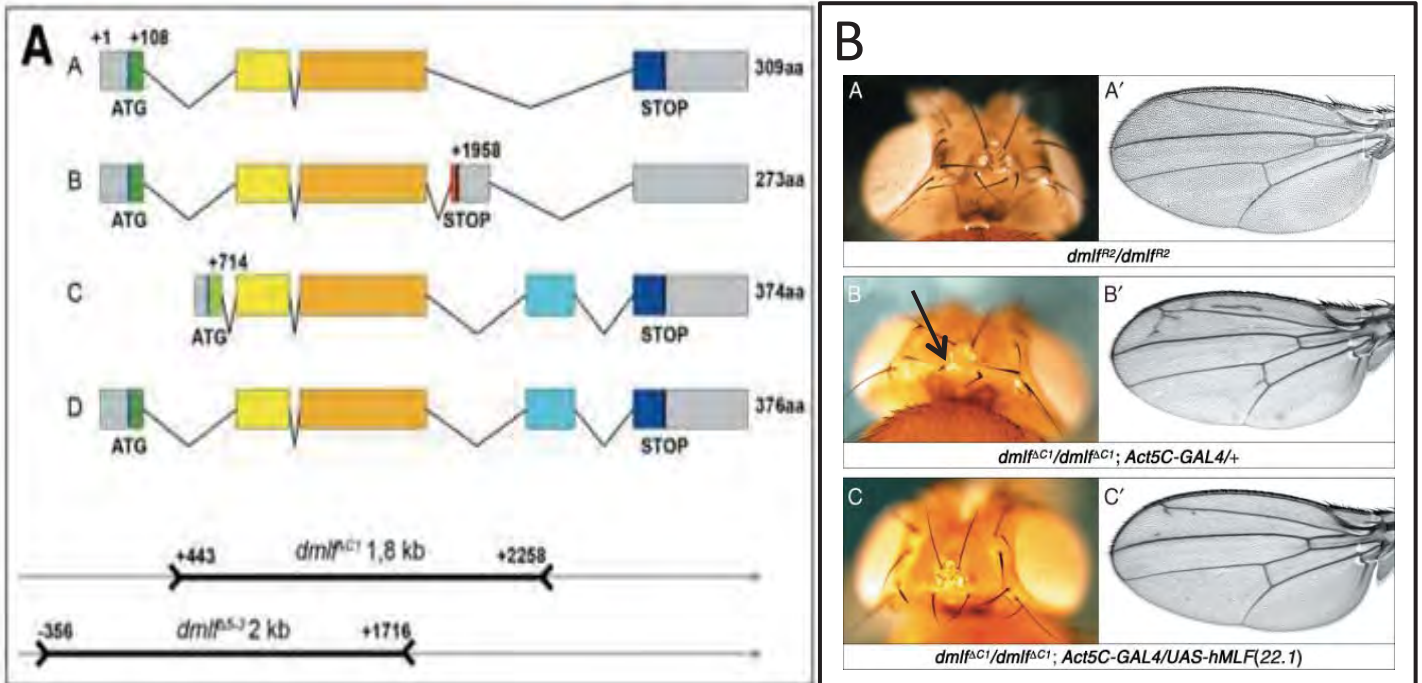
##### **III.A.1. La famille MLF chez les mammifères**

Le membre fondateur de la famille MLF, MLF1 (Myeloid Leukemia Factor 1), a été identifié en 1996 en clonant les points de cassure de la translocation t(3;5)(q25.1;q34), un réarrangement chromosomique associé au développement SMD et de LAM (Yoneda-Kato et al., 1996) (**Figure 17**). Les protéines de la famille MLF semblent présentes chez tous les métazoaires (Martin-Lannerée et al., 2006). Chez les mammifères, la famille MLF est constituée de deux membres présentant près de 40% d'identité entre eux : MLF1 et MLF2. Au niveau moléculaire, hMLF1 et hMLF2 sont des protéines nucléo-cytoplasmiques relativement petites (+/- 270 acides aminés). hMLF1 possède deux motifs lui permettant de naviguer entre le noyau et le cytoplasme : un motif d'export nucléaire (NES) en N-terminal et un signal de localisation nucléaire (NLS) en C-terminale (Yoneda-Kato et Kato, 2008). A l'exception d'un domaine central conservé au sein de la famille MLF et d'un domaine de liaison aux protéines 14-3-3 $\zeta$ , hMLF1 et hMLF2 sont dépourvues de structures ou motifs particuliers (**Figure 17**).

##### **III.A.2. MLF chez la Drosophile**

Chez la Drosophile un seul gène, situé dans la région 52D du chromosome II, code pour MLF. Il existe quatre isoformes qui sont issues d'épissage alternatif (MLF-A à D) et qui contiennent entre 273 et 376 acides aminés (Martin-Lannerée et al., 2006) (**figure 18A**). L'isoforme principale, MLF-A, présente 28% d'identité avec hMLF1 et hMLF2 (Gobert et al., 2012). La région centrale de MLF (acide aminés 96 à 202), région la plus conservée,





**Figure 18 : Transcrits et mutants *mlf* chez la Drosophile.**

(A) Structure des transcrits *dmf*. L'étendue des délétions de *mlf* dans chacun des deux allèles mutants disponibles (*dmf*<sup>ΔC1</sup> et *dmf*<sup>Δ5-3</sup>) est indiquée. (B) Phénotypes observés chez les *Drosophiles* adultes mutantes pour *mlf*. Photos de la tête (A, B, C) ou d'une aile (A', B', C') de *Drosophile* du génotype indiqué. Les *Drosophiles* mutantes pour *dmf* présentent une absence de microchaetes (B) ainsi que la formation de veines ectopiques au niveau de la veine L2 des ailes (B'). Ces phénotypes sont sauvés par réexpression de hMLF avec le pilote ubiquitaire actine5C (C et C'). (D'après Martin-Lannerée et al., 2006).

possède quant à elle environ 50% d'identité avec hMLF1 et hMLF2 (**figure 17**). Un signal d'export nucléaire (NES) et deux sites de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiés dans MLF et une étude montre que ces deux NLS sont requis pour permettre l'adressage nucléaire de MLF-A dans des cellules de *Drosophila* en culture (Sugano et Yamaguchi, 2007). Enfin, excepté un site de liaison aux protéines adaptatrices de la famille 14-3-3 en carboxy-terminal, MLF ne possède pas d'homologie avec des protéines déjà connues permettant de formuler d'hypothèse quant à sa fonction moléculaire.

Le profil d'expression de *mlf* montre qu'il présente une forte contribution maternelle pendant les premiers stades embryonnaires avant d'être exprimé, après le stade blastoderme, de manière ubiquitaire dans l'embryon. Cette expression est cependant plus forte dans le système nerveux central, les gonades, le tube digestif et les cellules à cristaux (Bras et al., 2012; Martin-Lannerée et al., 2006). Aux différents stades larvaires *mlf* est également exprimé ubiquitairement (Martin-Lannerée et al., 2006). La protéine MLF est observée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, dans des ratios différents selon les tissus et les stades de développement (Martin-Lannerée et al., 2006).

La mobilisation imprécise d'un élément transposable situé dans le 1<sup>er</sup> intron de *mlf* a permis de générer deux allèles mutants nuls pour *mlf*. Dans le premier mutant, le codon d'initiation de la traduction et la région la plus conservée ont été éliminés alors que dans le second la majeure partie de la région codante est absente (**Figure 18A**). A l'état homozygote, une partie des individus mutant pour *mlf* survivent jusqu'au stade adulte et ne présentent pas de défauts morphologiques marqués mise à part la perte de certaines soies appelées microchaetes au niveau de la tête ainsi que la formation de veines ectopiques au niveau de la veine L2 des ailes (**figure 18B**) (Martin-Lannerée et al., 2006). Les premières analyses de ces mutants pour *mlf* n'ont donc pas permis de révéler clairement ses fonctions *in vivo*.

### **III.B. Rôle des membres de la famille MLF dans l'hématopoïèse et la leucémogénèse**

#### **III.B.1. hMLF1 dans le développement des MDS et des LAM**

hMLF1 a été identifié en clonant les points de cassure de la translocation chromosomique t(3;5)(q25.1 ; q34) associée au développement de LAM et de MDS (Lim et al., 2010; Yoneda-Kato et al., 1996). Cette translocation rare est à l'origine de la production

de la protéine de fusion NPM-MLF1 qui est composée de la partie N-terminale de la Nucléophosmine (NPM), contenant un signal de localisation nucléaire et un domaine de dimérisation, fusionnée à la quasi-totalité de MLF1 (**figure 17**). NPM est une protéine nucléolaire impliquée dans de nombreuses fonctions telles que le transport de protéines ribosomales, le contrôle de la progression du cycle cellulaire, le maintien de la stabilité du génome ou encore l'assemblage/désassemblage des nucléosomes (Colombo et al., 2011). Différentes données soutiennent un rôle direct de NPM-MLF1 dans la transformation maligne. En effet, l'expression de NPM-MLF1 augmente le potentiel prolifératif des progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* et facilite la transformation oncogénique induite par RasV12 dans des fibroblastes embryonnaires murins (Lee et al., 2012; Yoneda-Kato et Kato, 2008). *NPM1* est également muté dans de nombreux autres cas de leucémies et est impliqué dans deux autres translocations, l'une avec ALK et l'autre avec RAR $\alpha$  (Falini et al., 2007). Il a été proposé que dans le cas des translocations, NPM convertisse ses partenaires de fusion en oncoprotéines en leur apportant un domaine d'oligomérisation ainsi qu'un NLS. En effet, alors que MLF1 est majoritairement retrouvée au niveau du cytoplasme, NPM-MLF1 est quant à elle nucléaire et ce que ce soit après transfection ou dans des cultures primaires MDS/AML t(3 ;5) (Falini et al., 2006; Ohno et al., 2000). Il est également à noter que suite à cette translocation t(3 ;5) l'expression de *MLF1* est dérégulée puisqu'il se retrouve sous le contrôle des régions 5' régulatrices de *NPM1*. D'autre part, il a été observé que l'expression de *MLF1* augmente au cours de la progression de MDS en AML et qu'une expression élevée de *MLF1* chez des patients ne portant pas la translocation t(3 ;5) est associée à un mauvais pronostic. Ainsi, la dérégulation de l'expression de *MLF1* pourrait participer à la transformation maligne des cellules myéloïdes (Matsumoto et al., 2000). Par ailleurs *MLF1* pourrait avoir une fonction oncogénique dans d'autres tissus. En effet, *MLF1* est surexprimé dans des carcinomes squameux du poumon (Sun et al., 2004) et est amplifié dans des carcinomes de l'œsophage (Chen et al., 2008). A l'inverse, une étude très récente a mis en évidence une perte totale de *MLF1* dans des cas de leucémies aiguës lymphoïdes T du nourrisson (Mansur et al., 2015). *MLF1* pourrait donc jouer un rôle de suppresseur de tumeur ou d'oncogène selon les cellules. A l'heure actuelle le rôle et mécanisme d'action de *MLF1* dans la transformation leucémique restent donc à établir.

### **III.B.2. MLF1 et l'hématopoïèse chez les mammifères**

Jusqu'à présent les fonctions de *MLF1* au cours de l'hématopoïèse chez l'Homme n'ont pas été caractérisées, mais son profil d'expression suggère qu'il est impliqué dans la différenciation des cellules hématopoïétiques en contexte normale. En effet, *MLF1* est fortement exprimé dans les cellules progénitrices CD34+ et son expression diminue dès l'engagement de ces cellules vers la différenciation myéloïde et érythroïde (Matsumoto et al., 2000).

Chez la souris, MLF1/HLS7 (Hematopoietic Lineage Switch 7), a été identifié au cours d'un crible visant à mettre en évidence les gènes contrôlant la transition de cellules érythroleucémiques (J2E) vers des cellules présentant une morphologie typique de cellules myéloïdes immatures (J2E-m2) (Williams et al., 1999). En effet, l'expression ectopique de MLF1 dans des cellules J2E diminue leur capacité à se différencier en érythrocytes matures (capables de synthétiser de l'hémoglobine) en réponse à l'érythropoïétine et provoque l'acquisition de phénotypes de type monocytes immatures. Mlf1 peut donc induire la reprogrammation des cellules érythroleucémiques vers des monocytes, phénomène appelé « lineage switching ». De plus, la surexpression de MLF1 dans des cellules hématopoïétiques primaires issues de foie fœtal ainsi que dans différentes lignées cellulaires a permis de confirmer qu'il promeut la différenciation des cellules myéloïdes et inhibe celle des cellules érythroïdes (Williams et al., 1999; Winteringham et al., 2004). Cependant, l'inactivation de *mlf1* chez la souris n'a toujours pas été réalisée et sa fonction *in vivo* reste donc à déterminer.

### **III.B.3. MLF et l'hématopoïèse chez la Drosophile**

Chez la Drosophile, MLF est fortement exprimé dans un des trois principaux lignages sanguins, les cellules à cristaux, et ce aussi bien aux stades embryonnaires que larvaires (Bras et al., 2012; Martin-Lannerée et al., 2006). De plus, il a été montré que *mlf* est une cible transcriptionnelle directe de LZ dans ces cellules (Bras et al., 2012; Ferjoux et al., 2007). D'autre part, MLF a été identifié en tant que régulateur positif de l'activité du complexe SRP/LZ lors d'un crible pan génomique par interférence à l'ARN (RNAi) visant à identifier des modulateurs de l'activité de ce complexe en culture cellulaire. En effet, l'inhibition de l'expression de MLF par RNAi dans les cellules Kc167 (une lignée dérivée d'hémocytes embryonnaires) entraîne une diminution de la transactivation d'un gène rapporteur cible de SRP/LZ (Gobert et al., 2010). Les résultats obtenus par la suite ont permis de montrer que

MLF régule l'activité de ce complexe en permettant l'expression stable de LZ aussi bien *in cellulo* dans les Kc167 qu'*in vivo* dans les cellules à cristaux (Bras et al., 2012).

En lien avec son rôle dans la régulation du niveau de LZ, MLF régule le développement du lignage hématopoïétique LZ+ embryonnaire et larvaire (Bras et al., 2012). Pendant l'hématopoïèse embryonnaire, MLF est requis pour le maintien des cellules LZ+. En absence de *mlf*, ces cellules sont spécifiées normalement mais leur nombre diminue progressivement au cours du développement de l'embryon. Ce phénotype est probablement lié à un défaut d'accumulation de LZ qui empêche l'autorégulation de l'expression de *lz* et le maintien des cellules à cristaux embryonnaires. En effet, la réexpression de LZ dans les cellules LZ+ est capable de restaurer un nombre normal de cellules à cristaux dans les embryons mutants pour *mlf*. De façon étonnante, dans les larves mutantes pour *mlf*, on observe une augmentation du nombre de cellules LZ+ en circulation sans blocage apparent de leur différenciation en cellules à cristaux. Ce phénotype « myélodysplasique » est accompagné d'une diminution du niveau de LZ et, comme dans l'embryon, est sauvé par la réexpression de LZ, suggérant que les phénotypes associés à la perte de MLF sont dus à la diminution du niveau de LZ.

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'induction de l'expression de MLF par le complexe SRP/LZ contribue au développement des cellules à cristaux par une boucle de rétrocontrôle positif sur l'activité de LZ.

Il est intéressant de noter ici que la régulation du niveau de LZ par MLF n'est pas observée uniquement dans le système hématopoïétique. En effet, une analyse clonale réalisée chez la larve montre que MLF est aussi requis pour l'expression normale de LZ dans le disque d'œil. Cependant, l'absence de MLF n'induit qu'une diminution assez faible du niveau de LZ dans ce disque et ne s'accompagne pas de défauts morphologiques de l'œil adulte (Bras et al., 2012).

Pour finir, des résultats préliminaires suggèrent que *mlf* est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de la glande lymphatique puisqu'en absence de MLF cet organe est hyperplasique et présente une diminution de la population de prohémyocytes au profit de cellules différenciées (Bras et al., 2012).

#### **III.B.4. Conservation de MLF entre la Drosophile et l'Homme**

Différentes données révèlent un étonnant niveau de conservation du rôle de MLF dans les cellules sanguines entre la Drosophile et l'Homme. D'une part, la protéine MLF1 humaine

peut se substituer à MLF dans le lignage des cellules à cristaux puisque les phénotypes hématopoïétiques observés en contexte mutant pour *mlf* (augmentation du nombre de cellules à cristaux et diminution du niveau de LZ) sont sauvés par hMLF1. D'autre part, MLF est aussi requis pour l'expression et l'activité de la protéine leucémogène humaine RUNX1-ETO dans le modèle Drosophile de « leucémie » induite par cette protéine de fusion (Bras et al., 2012). De façon similaire, la déplétion de hMLF1 dans des cellules leucémiques t(8 ;21)+ induit une diminution de l'expression de RUNX1-ETO et de la prolifération de ces cellules. Ces résultats suggèrent donc que la régulation de l'expression de facteurs de type RUNX est une caractéristique conservée des protéines MLF qui pourrait jouer un rôle dans certaines leucémies (Bras et al., 2012). Il est également intéressant de noter ici que LZ et RUNX1-ETO ont en commun leur domaine de liaison à l'ADN, domaine également commun à tous les membres de la famille RUNX. Il est donc envisageable que MLF régule le niveau d'expression de RUNX1, RUNX2 et RUNX3, protéines dont la dérégulation du niveau d'expression a été associée à diverses pathologies chez l'Homme.

### **III.C. Autres fonctions des protéines MLF**

#### **III.C.1. MLF et suppression de la toxicité induite par les protéines à poly-glutamines**

Chez l'homme, les expansions de glutamines (poly-Q) sont à l'origine de nombreuses pathologies neurodégénératives. Parmi ces pathologies on retrouve la maladie de Huntington (MH), la maladie de Kennedy ou amyotrophie spino-bulbaire (SBMA), l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) et 6 ataxies spino-cérébelleuses dominantes (ADCA de type 1, 2, 3, 6, 7, et 17). Les protéines à poly-glutamines s'accumulent, s'agrègent entre elles et deviennent toxiques pour la cellule. De nombreuses études ont utilisé la Drosophile comme modèle pour l'étude de la toxicité de ces protéines ainsi que pour l'identification de facteurs régulant cette toxicité par des cribles génétiques. Ainsi, il a été démontré que l'expression de protéines polyQ est toxique pour les cellules de l'œil de Drosophile, entraînant une dégénération/dépigmentation progressive de l'œil chez l'adulte, et que la surexpression de MLF (tout comme celle de hMLF1 ou hMLF2) permet de réduire cette toxicité (Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2002; Martin-Lannerée et al., 2006). Dans ce modèle, la surexpression de MLF améliore en effet l'aspect extérieur de l'œil mais les agrégats protéiques sont cependant



toujours présents dans les cellules. De manière intéressante MLF se localise d'ailleurs au niveau de ces agrégats. Il est également à noter que ce système modèle a également permis d'identifier plusieurs protéines chaperonnes dont la protéine DNAJ1 en tant que suppresseur de toxicité induite par les polyQ (cf Chapitre IV).

Dans des cellules primaires neuronales de rat, la surexpression de polyQ induit également la formation d'inclusions intranucléaires toxiques pour les cellules qui présentent une inhibition de la croissance dendritique associée à une réduction du volume somatique. Ces phénotypes sont également supprimés par la surexpression de dMLF, hMLF1 ou hMLF2, suggérant à nouveau que la suppression de la toxicité induite par les protéines polyQ est une fonction conservée des protéines MLF (Kim et al., 2005). Il est à noter que si la présence d'inclusions cristallines ne semble pas affectée par la surexpression de MLF dans l'œil de *Drosophile*, MLF diminue le pourcentage de cellules présentant ces inclusions dans les cellules neuronales de rat. De manière intéressante, dans ce contexte, MLF réduit aussi le recrutement de la protéine chaperonne Hsp70 dans ces inclusions.

Un autre lien entre MLF, polyQ et protéines chaperonnes pourrait être les protéines de la famille 14-3-3. En effet, les membres de la famille MLF présentent un site de liaison aux protéines 14-3-3. Ces protéines ont initialement été décrites en tant que régulateur de la conformation tridimensionnelle de nombreuses protéines (Obsil et al., 2001; Tzivion et al., 1998) mais il a été proposé que la protéine 14-3-3 $\zeta$  agisse comme une chaperonne (Yano et al., 2006) puisqu'elle possède des caractéristiques propres à cette famille de protéines (cf chapitre IV). Notamment 14-3-3 $\zeta$ , tout comme les protéines de la famille 14-3-3 (sept chez les mammifères contre deux chez la *Drosophile*), possède une activité d'hydrolyse de l'ATP, et l'expression de 14-3-3 $\zeta$  est induite suite à un choc thermique par le facteur de transcription HSF (Heat-Shock Factor). De plus, 14-3-3 $\zeta$  est impliquée *in vivo* chez la *Drosophile* dans la re-solubilisation de l'apocytochrome c, complexe protéique mitochondrial qui forme des agrégats en contexte de choc thermique, ainsi que dans la re-solubilisation (*in vitro* et en collaboration avec les protéines Hsp70/Hsp40) des agrégats formés par la citrate synthase. Enfin, 14-3-3 $\zeta$  et  $\epsilon$  contribuent à la cytotoxicité induite par une protéine polyQ dans un modèle *Drosophile* d'ataxie spino-cérébelleuse (Chen et al., 2003).

### **III.C.2. MLF et cycle cellulaire**

#### **III.C.2.a. Chez les mammifères**



Différentes observations pointent un rôle de MLF1 au cours du cycle cellulaire et plus spécifiquement lors de la transition G1/S. En effet, la surexpression de hMLF1 prévient la différenciation érythroïde des cellules érythroleucémiques J2E induites par l'érythropoïétine en empêchant l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de l'inhibition du complexe CyclineE/CDK2 par p27<sup>Kip1</sup> (Winteringham et al., 2004). L'action de hMLF1 conduit à la stabilisation de deux composants du complexe E3 ubiquitine ligase SCF, la Cullin1 et Skp2, complexe impliqué dans la dégradation de p27<sup>Kip1</sup> par le protéasome. Au contraire, la surexpression de hMLF1 dans des fibroblastes de souris induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 de manière dépendante de p53. Dans ce cas, il a été proposé que hMLF1 stabilise p53 en interférant avec la sous-unité 3 du complexe signalosome COP9 (CSN3) qui est impliqué dans la dégradation de p53 (Yoneda-Kato et al., 2005). Il apparaît donc que selon les contextes hMLF1 puisse agir soit comme un régulateur positif soit comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire.

Un élément de contrôle de la fonction de MLF1 dans le cycle cellulaire pourrait passer par la régulation de sa localisation subcellulaire. En effet, il a été montré que hMLF1 est nucléaire dans les cellules sanguines immatures mais s'accumule dans le cytoplasme des cellules différenciées (Winteringham et al., 2006). De plus, la mutation du signal d'export nucléaire de hMLF1 augmente son activité antiproliférative et interfère avec le potentiel oncogénique de NPM-MLF1 (Yoneda-Kato et Kato, 2008). Trois partenaires de MLF1 ont été proposés comme régulateurs de sa localisation subcellulaire : hnRNP-U-L2/MANP (MLF1-Associated Nuclear Protein) favoriserait son accumulation nucléaire alors que MADM (MLF1-Associated Molecule), en phosphorylant le motif de liaison aux protéines 14-3-3 de MLF1, favoriserait son interaction avec 14-3-3 $\zeta$  et participerait à sa rétention cytoplasmique (Lim et al., 2002; Winteringham et al., 2006). Cependant, des travaux récents suggèrent que la localisation subcellulaire de hMLF1 est indépendante des protéines 14-3-3 (Molzan et Ottmann, 2013).

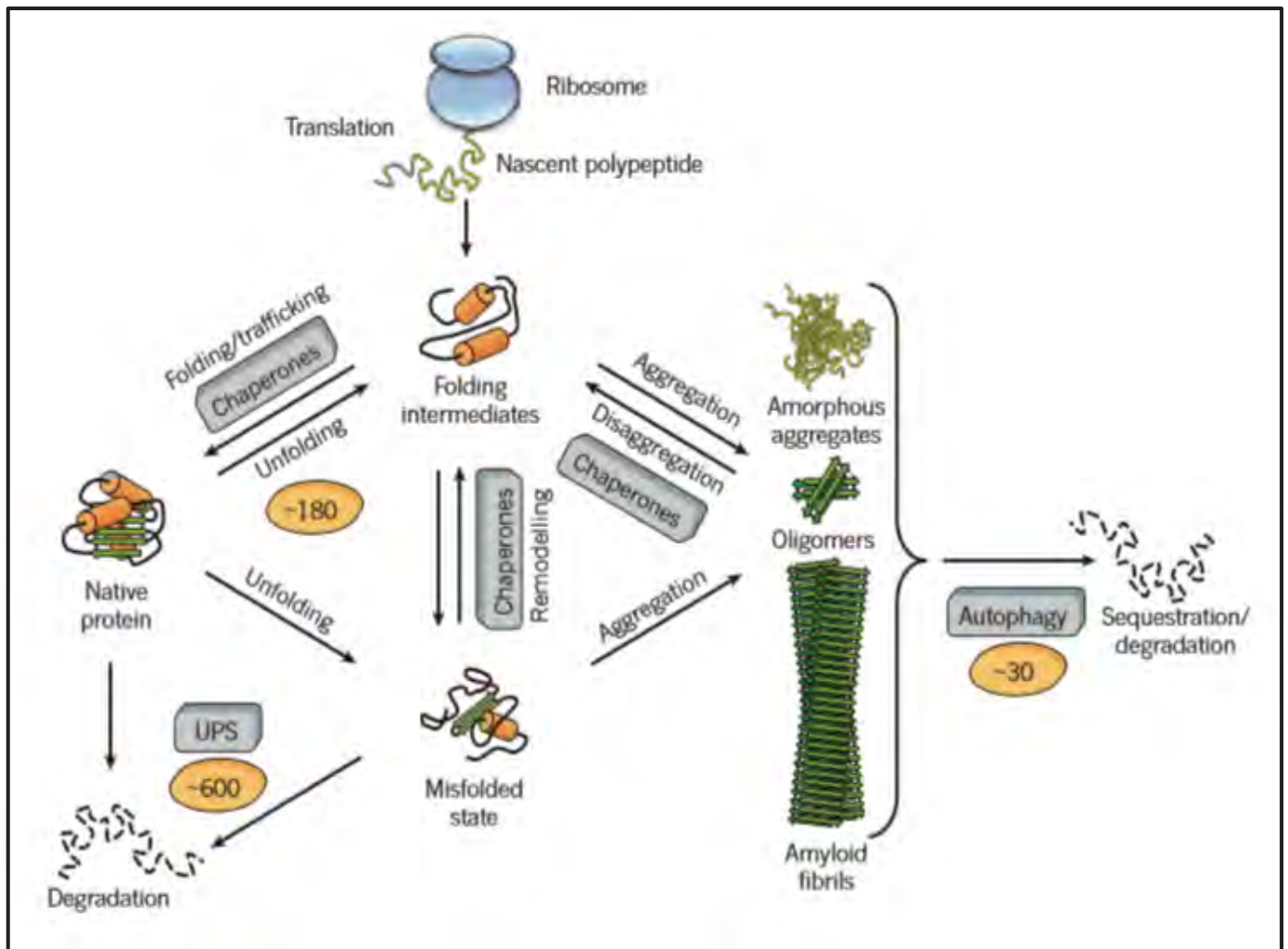
### **III.C.2.b. Chez la Drosophile**

Chez la Drosophile la surexpression de MLF dans les disques imaginaux d'œil ou d'aile entraîne à la fois une entrée en apoptose et une augmentation de la réplication des cellules (Fouix et al., 2003). De plus, MLF a été identifié lors d'un crible double hybride visant à mettre en évidence les partenaires de DREF (DNA Replication Enhancer Factor) (Ohno et al., 2000). Ce facteur de transcription est connu pour promouvoir l'expression de

nombreux gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et la prolifération comme par exemple les gènes codant la DNA polymérase alpha (les deux sous-unités de 180 et 73 kDa), PCNA, dE2F1 ou encore la Cycline A. Il a été montré que le phénotype induit par la surexpression de DREF dans le disque imaginaire d'œil est fortement supprimé par la surexpression de MLF (Ohno et al., 2000) et une étude récente propose que MLF interagisse avec DREF pour activer la transcription de la kinase de la voie JNK, *basket*, et ainsi induire l'apoptose (Yanai et al., 2014). Enfin, les phénotypes causés par la surexpression de MLF dans l'œil sont sensibles à la présence de deux protéines qui interagissent avec ce facteur : CSN3 (Sugano et al., 2008) et Suppressor of Fused (Su(fu)), un régulateur négatif de la voie Hedgehog (Fouix et al., 2003). Il semble donc que, comme chez les mammifères, la surexpression de MLF affecte la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

### **III.C.3. Fonctions de MLF2**

Mis à part sa capacité à supprimer la cytotoxicité polyQ (cf ci dessus), très peu de données sont disponibles sur MLF2 chez les vertébrés. Chez le poulet, la résistance à une infection par des parasites intestinaux (coccidiose) qui affecte la croissance est associée à des polymorphismes dans *MLF2* (Hong et al., 2011; Kim et al., 2010). D'autre part, il a été montré récemment que l'inhibition de hMLF2 interfère avec la croissance de tumeurs du sein et le développement de métastases dans un modèle de xénogreffe chez la souris, et des mutations ponctuelles potentiellement « gain de fonction » dans MLF2 (D12H ou R158W) ont été trouvées dans des métastases pulmonaires des patients atteints de cancer du sein (Dave et al., 2014). De façon intéressante, l'expression de MLF2 semble régulée par la voie de l'hypoxie et pourrait agir sur les tumeurs en promouvant l'expression des NOS (Nitric Oxyde Synthase).



**Figure 19 : Les protéines chaperons et le maintien de l'homéostasie des protéines.**

Les protéines chaperons participent au repliement des protéines néosynthétisées ou mal repliées et empêchent ainsi leur agrégation. Lorsqu'il y a formation d'agrégats protéiques elles sont également impliquées dans les processus de désagrégation. Dans le cas où les protéines ne peuvent pas être repliées correctement, elles sont adressées aux voies de dégradation protéolytiques et dégradées. Les protéines monomériques sont plutôt dégradées par la voie Ubiquitine/protéasome alors que les agrégats sont eux éliminés par un mécanisme d'autophagie. (D'après Yujin et al.,2013).

## **IV. Les chaperons de la famille DnaJ/Hsp40**

Ayant identifié le co-chaperon DNAJ1 en tant que partenaire de MLF impliqué dans le développement des cellules à cristaux chez la larve, dans ce dernier chapitre je décrirai plus en détail les protéines de cette famille, leur lien fonctionnel avec les protéines de la famille HSP70, les données existant sur le rôle de ces deux familles de chaperons au cours de l'hématopoïèse ainsi que leur lien avec le développement de pathologies.

### **IV.A Généralités sur les chaperons**

Les protéines de la famille DnaJ/Hsp40 appartiennent à la grande famille des chaperons moléculaires. Ces derniers sont retrouvés aussi bien chez les bactéries que chez les végétaux et les eucaryotes supérieurs et représentent le système le plus conservé du règne vivant (Lindquist, 1986). Ce sont les gardiens de l'homéostasie des protéines dans la cellule en condition physiologique et en condition de stress (Saibil, 2013). Les chaperons lient des substrats protéiques (ou « clients ») dont ils modulent l'intégrité ou l'activité par différents mécanismes. Ils régulent de nombreux processus allant du repliement des protéines néo-synthétisées ou mal-repliées à la régulation de leur stabilité et de leur localisation subcellulaire. En condition physiologique, ils reconnaissent des régions hydrophobes des protéines en cours de synthèse et préviennent ainsi les interactions aspécifiques avec d'autres protéines ainsi que la formation d'agrégats insolubles létaux pour la cellule. En condition de stress, les chaperons interagissent avec les protéines dénaturées/mal repliées et tentent de les replier correctement. Si les protéines ne peuvent pas être repliées correctement, elles sont adressées aux voies de dégradation protéolytiques et dégradées (**Figure 19**). Les chaperons jouent donc un rôle cytoprotecteur, ils protègent les cellules contre différents types de stress et permettent de ce fait à l'organisme de survivre dans des conditions défavorables.

### **IV.B Les protéines de choc thermique**

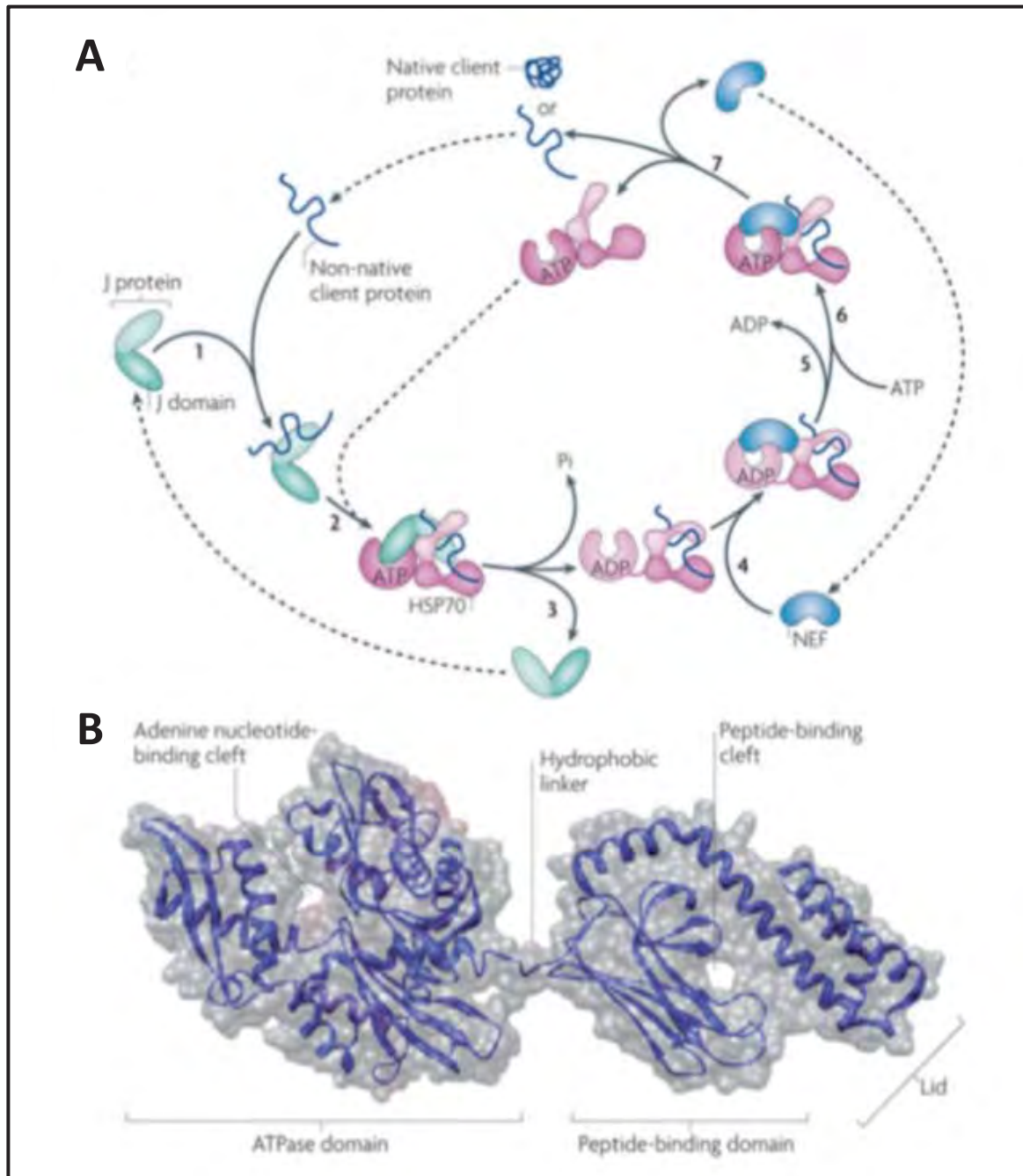
Le plus grand et le mieux caractérisé des groupes de chaperons est composé des protéines Hsp pour « Heat Shock Protein ». La réponse au choc thermique a été découverte en

1962 par Ritossa, qui a caractérisé une transcription anormale de certains loci sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires de *Drosophiles* suite à une élévation de la température (Jamrich et al., 1977). Les études menées depuis montrent que d'autres stress comme le stress de réticulum endoplasmique, les carences nutritives ou les infections virales, peuvent induire ou augmenter l'expression des Hsp (Arrigo, 2005). De plus, certaines Hsp sont constitutivement exprimées et possèdent des fonctions de ménage (Vos et al., 2008). De nombreuses Hsp sont des chaperons et jouent un rôle important dans l'homéostasie des protéines en se liant aux polypeptides néo-synthétisés, en catalysant leur maturation conformationnelle ou en participant au contrôle qualité des protéines. Elles interviennent aussi lors des translocations protéiques dans les différents compartiments cellulaires.

L'induction de l'expression des gènes codant les protéines de stress s'effectue suite à la trimérisation de facteurs de transcription spécifiques nommés HSF (Heat Shock Factor). Les HSF sont constitutivement liés à certaines Hsp ubiquistes. Lors d'un stress, l'affinité entre les résidus hydrophobes des protéines dénaturées et les Hsp étant plus importante que celle entre les Hsp et les HSF, la liaison entre les Hsp et les HSF est déstabilisée ce qui entraîne la libération des HSF dans le cytosol. Suite à leur trimérisation et à leur phosphorylation ils vont migrer dans le noyau et se lier aux séquences consensus HSE (Heat Shock Element) localisées sur les promoteurs des gènes de choc thermique pour en activer l'expression (Wu, 1995).

Selon leur poids moléculaire, chez les mammifères, les Hsp sont regroupées en six familles principales : Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47 et la famille des petites protéines de stress, les sHsps pour « small Hsp ». Ces familles possèdent des propriétés communes mais également des spécificités vis-à-vis de leur localisation subcellulaire (cytoplasme, mitochondrie, RE), de leur mécanisme d'action, de leur dépendance à l'ATP ou de leur nature inductible ou non. Il est à noter ici qu'historiquement les chaperons inductibles sont notés Hsp (Heat shock protein) alors que les chaperons exprimés de manière constitutive sont notés Hsc (Heat shock cognate protein). Ces chaperons forment un vaste réseau moléculaire que l'on peut schématiquement subdiviser en quatre familles de chaperons ATP-dépendant (Hsp60, Hsp70, Hsp90 et Hsp100) dont l'activité est modulée par leur interaction avec des co-chaperons spécifiques tels que DnaJ/HSP40 pour les Hsp70 ou les co-chaperons à domaine TRR pour les Hsp90.

#### **IV.C. Les protéines de la famille DnaJ : Description**



**Figure 20 : Mode d'action canonique et structure tridimensionnelle des protéines de la famille Hsp70**

(A) Cycle d'activation canonique des Hsp70. (1) DnaJ, qui possède une affinité importante pour Hsp70 lié à l'ATP, reconnaît un substrat spécifique et (2) le présente au chaperon Hsp70. (3) DnaJ stimule l'activité ATPasique de Hsp70, et l'hydrolyse de l'ATP en ADP induit un changement de conformation de la poche de liaison du substrat, ce qui permet de modifier sa conformation. Comme DnaJ possède une affinité réduite pour Hsp70 lié à l'ADP, il est libéré. (4) La liaison du facteur NEF (nucleotide exchange factor) au chaperon Hsp70 entraîne (5) la libération de la molécule d'ADP et (6) la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP qui va ainsi induire l'ouverture de la poche C-terminale de Hsp70 et (7) la libération du substrat modifié. Un même substrat peut subir plusieurs cycles successifs si nécessaire. (B) Structure des protéines Hsp70. Ces chaperons sont schématiquement constitués de deux « poches », l'une N-terminale qui lie l'ATP et porte l'activité ATPasique, l'autre C-terminale qui fixe le substrat et permet son repliement. Ces deux poches sont connectées par une séquence linker flexible (d'après Kampinga et Craig, 2010).



#### **IV.C.1. Le couple Hsp70-DnaJ**

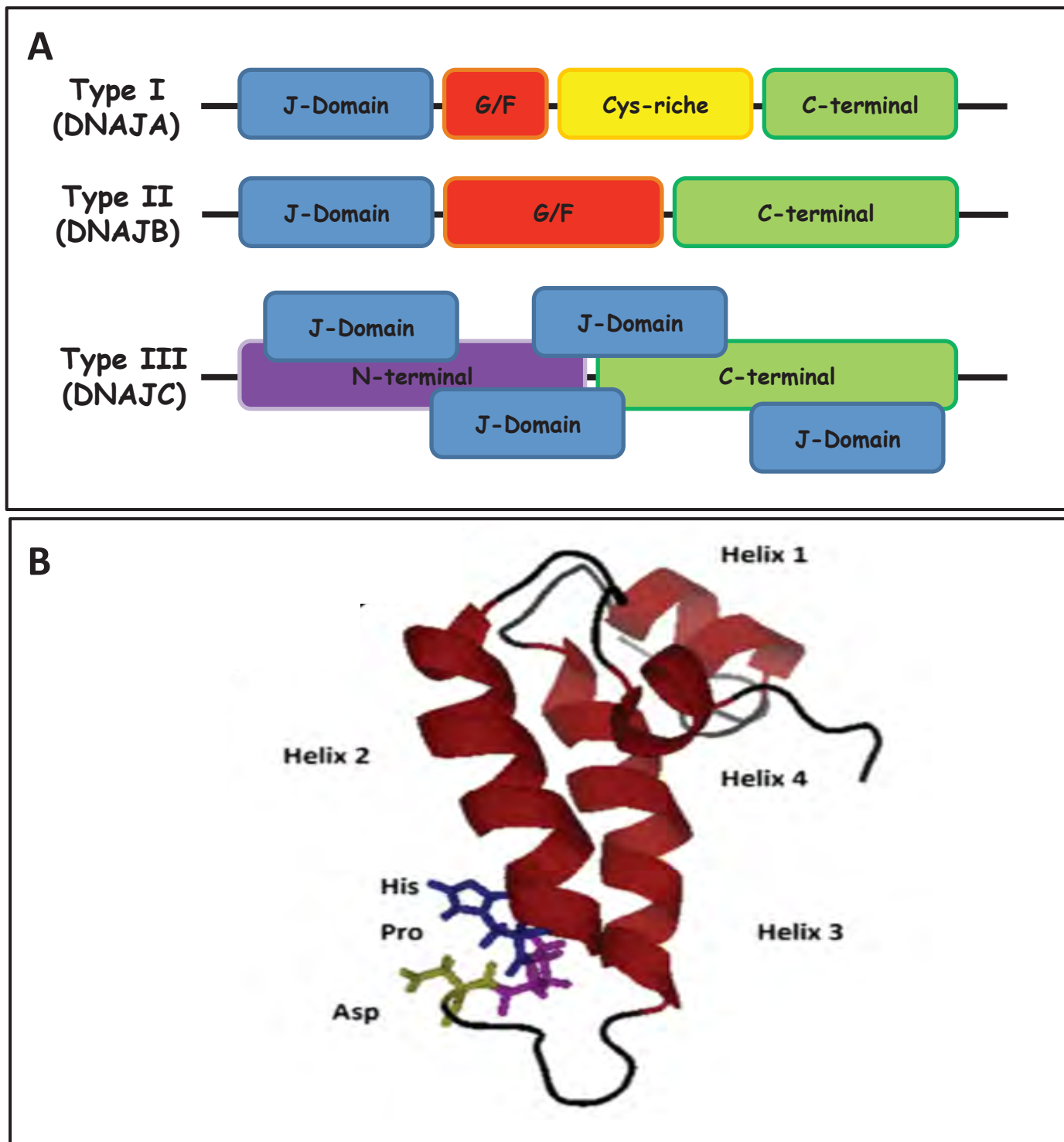
Le membre fondateur de cette famille, DnaJ, a été identifiées chez *Escherichia coli* en tant que régulateur de l'activité ATPase de DnaK, l'homologue de Hsp70 (Yochem et al., 1978). Chez cette bactérie, DnaK est constituée schématiquement de deux « poches », l'une N-terminale qui lie l'ATP et porte l'activité ATPasique, l'autre C-terminale qui fixe le substrat et permet son repliement. Son cycle d'activation pour l'aide au repliement des protéine suit le modèle suivant (**Figure 20**): la liaison de DnaK à l'ATP lui permet d'adopter une conformation ouverte avec la poche de liaison au substrat exposée. Parallèlement, le co-chaperon DnaJ, interagit transitoirement avec le substrat via son domaine C-terminal et avec DnaK via son domaine J (N-terminal). DnaJ transfère le substrat à DnaK et stimule son activité ATPasique. L'hydrolyse de l'ATP en ADP induit un changement de conformation de la poche de liaison du substrat, ce qui permet de modifier sa conformation. Comme DnaJ possède une affinité réduite pour DnaK lié à l'ADP, il est libéré. La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP induit l'ouverture de la poche C-terminale de DnaK, d'où la libération du substrat modifié. Un même substrat peut subir plusieurs cycles successifs si nécessaire, ou être dirigé vers le protéasome pour être dégradé en cas d'échec. Les protéines de la famille DnaJ/Hsp40 interviennent donc de manière canonique dans la présentation du peptide substrat aux protéines chaperons Hsp70 ainsi que dans la stimulation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de ces dernières.

Bien que l'effet majeur de DnaJ sur DnaK soit la stimulation de son activité ATPasique, DnaJ possède également une activité de chaperon par elle-même. Ainsi elle est capable de renaturer la luciférase dénaturée *in vitro* (Fink, 1999). De plus, certaines protéines DnaJ sont des régulateurs directs ou indirects des chaperons de la famille Hsp90 (Sterrenberg et al., 2011).

#### **IV.C.2 Structure et classification des protéines de la famille DnaJ**

Au niveau moléculaire, toutes les protéines de la famille DnaJ possèdent, généralement en amino-terminal, un domaine J leur permettant d'interagir avec les protéines Hsp70s (Corsi et Schekman, 1997; Szyperski et al., 1994). Ce domaine est constitué d'environ 70 acides aminés organisés en une structure formée de quatre hélices et d'une boucle située entre les hélices II et III et qui contient un motif hautement conservé, le motif HPD





**Figure 21 : Classification et domaines fonctionnels des protéines de la famille DnaJ/Hsp40.**

(A) Selon les domaines qu'elles possèdent les protéines de la famille DnaJ sont regroupées en trois groupes distincts. Dans le premier groupe (type I), le domaine J est suivi d'un domaine riche en glycine/phénylalanine (G/F) et par une répétition de cystéines (Cys-riche), les protéines du deuxième groupe (type II) possèdent uniquement le domaine riche en glycine/phénylalanine alors que celles du troisième groupe (type III) ne possèdent aucun de ces deux domaines et leur domaine J peut se situer n'importe où. (B). Structure tridimensionnelle du domaine J de DnaJ de *E. coli*. Ce domaine est organisé en une structure formée de quatre hélices et d'une boucle située entre les hélices II et III et qui contient un motif hautement conservé et essentiel à la stimulation de l'activité ATPase des Hsp70, le motif Histidine-Proline-Acide aspartique (His-Pro-Asp). (Adapté de Sterrenberg et al., 2011)

(Histidine-Proline-Acide aspartique) qui est essentiel à la stimulation de l'activité ATPase des Hsp70 (**Figure 21A**) (Qian et al., 1996).

Chez l'homme la famille des protéines Hsp40/DnaJ est composée de 49 membres (contre 11 pour les protéines de la famille Hsp70) et on en compte 44 chez la Drosophile. Ces protéines sont classées en trois types selon la présence ou non d'autres domaines: le type I (ou A) possède un domaine riche en glycine/phénylalanine ainsi qu'une répétition de cystéines, le type II (ou B) possède uniquement le domaine riche en glycine/phénylalanine et le type III (ou C) ne possède aucun de ces deux domaines (Cheetham et Caplan, 1998) (**Figure 21B**). Ces protéines sont retrouvées aussi bien au niveau du cytosol que dans les mitochondries, le noyau, le réticulum endoplasmique, les endosomes ou encore les ribosomes et leur expression peut être ubiquitaire ou restreinte à un tissu particulier. Certaines protéines de type I et II sont capables seules d'interagir avec des polypeptides non repliés et ont une fonction de chaperon indépendamment des protéines Hsp70 (Chai et al., 1999; Hageman et al., 2010; Kelley, 1998). En plus des domaines précédents, les protéines de la famille DnaJ peuvent également posséder d'autres domaines additionnels leur permettant d'exercer une fonction spécifique (Cunnea et al., 2003; Hosoda et al., 2003; Jermy et al., 2006; Lu et al., 2006; Shi et al., 2005).

DnaJ1 de Drosophile appartient à la classe II (B) et ses paralogues chez l'Homme sont DNAJB1, DNAJB4 et DNAJB5.

#### **IV.D. Les chaperons Hsp70/DnaJ et l'hématopoïèse**

A l'heure actuelle plusieurs études soulignent le rôle majeur des protéines chaperons de la famille Hsp70 au cours de l'érythropoïèse. Il a en effet été démontré que Hsp70 contrôle la viabilité des érythroblastes en empêchant leur mort par apoptose. Deux voies ont été proposées. Dans la première, Hsp70 inhiberait le clivage de GATA-1 par la Caspase 3. En effet, il a été démontré qu'au cours de l'érythropoïèse, l'activation des caspases entraîne le clivage de GATA-1 et l'arrêt de la maturation des érythrocytes ou leur apoptose (De Maria et al., 1999). De plus, une étude menée dans des érythroblastes en culture montre que suite à un traitement à l'Epo, Hsp70 se relocalise dans le noyau ou elle interagit avec GATA-1 et inhibe son clivage par la Caspase 3 (Ribeil et al., 2007). De fait, la phosphorylation de Hsp70 en réponse à l'Epo est nécessaire pour sa relocalisation dans le noyau et la différenciation des érythroblastes (Frisan et al., 2012). La seconde voie fait intervenir le facteur AIF (Apoptosis-inducing factor). Suite à un traitement à l'Epo, une dépolarisation des mitochondries est

observée. Celle-ci entraîne la libération des procaspases, du cytochrome C et du facteur AIF responsable de la fragmentation de l'ADN indépendamment des caspases (Lui et Kong, 2007; Zermati et al., 2001). Dans ce contexte, il a été proposé que Hsp70 limite l'activité apoptotique du facteur AIF en le séquestrant dans le cytoplasme (Lui et Kong, 2007). Une étude réalisée chez le poisson-zèbre montre quant à elle l'implication d'un chaperon mitochondriale de type Hsp70 au cours du développement des érythrocytes. En effet, dans ce modèle, la perte du chaperon Hspa9b (mutation faux-sens homozygote dans le domaine de liaison au substrat) induit un phénotype de type myélodysplasique (Craven et al., 2005). Ces animaux sont anémiés, les cellules sanguines ne se différencient pas en érythrocyte mature et meurent par apoptose.

Le rôle des protéines Dnaj dans l'hématopoïèse reste quant à lui largement inconnu. Néanmoins, une étude récente montre que la surexpression de DNAJB9, en favorisant le repliement des protéines du réticulum endoplasmique, favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques (van Galen et al., 2014).

Pour terminer les protéines chaperons sont également impliquées à différentes étapes de la production de l'hémoglobine (Uma et al., 1997; Weiss et dos Santos, 2009). En particulier, il a été montré récemment que la formation d'agrégats d'hémoglobine chez des patients atteints de  $\beta$ -thalassémie séquestre Hsp70 dans le cytoplasme (où il se lie à la chaîne alpha de la globine) et l'empêche de protéger GATA-1, ce qui induit un arrêt de maturation des érythrocytes et leur mort par apoptose (Arlet et al., 2014).

#### **IV.E Les chaperons dans le développement de pathologies**

Chez l'homme, l'importance des chaperons est soulignée par les conséquences toxiques de l'agrégation aspecific de protéines mal conformées, phénomène à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives (Borrell-Pagès et al., 2006; Muchowski et Wacker, 2005; Sherman et Goldberg, 2001). De part leur rôle dans la lutte contre l'agrégation protéique, les protéines de stress jouent un rôle central dans les maladies neurodégénératives causées par l'agrégation de protéines polyglutamiques. De nombreuses études ont en effet démontrées l'implication des systèmes de contrôle qualité des protéines, et notamment des chaperons Hsp70 et de DNAJ/Hsp40 dans différentes maladies neurodégénératives (Bilen et Bonini, 2007; Fernandez-Funez et al., 2000; Huang et al., 2006; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2000). Les chaperons sont également impliqués dans d'autres maladies neurodégénératives

causée par l'agrégation de protéines mal conformées comme la maladie d'Alzheimer (Dou et al., 2003) et la maladie de Parkinson (Huang et al., 2006). On notera en particulier que la surexpression de DnaJ1 permet de supprimer la cytotoxicité polyQ dans différents modèles Drosophile de neurodégénérescence (Chan et al., 2000; Fayazi et al., 2006; Fernandez-Funez et al., 2000; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2000) et que DnaJ1 coopère avec Hsp70 dans ce processus (Chan et al., 2000). Par contre, sa surexpression augmente la toxicité associée à la protéine TauV377M dans un modèle Drosophile de maladie d'Alzheimer (Blard et al., 2007). De plus, des mutations dans différents gènes codants pour des protéines de type DnaJ sont à l'origine de pathologies associées à des problèmes de protéostasie chez l'Homme (neuropathies, dystrophie musculaire, maladie de Parkinson...) (Koutras et Braun, 2014).

D'autre part, du fait de leur rôle cytoprotecteur, les chaperons favorisent parfois la sauvegarde d'anomalies, qui en s'accumulant pourraient participer à la cancérisation. Il a été montré que le niveau d'expression de différents chaperons (en particulier Hsp70 et Hsp90) augmente au cours du processus de transformation tumoral (Ciocca et Calderwood, 2005) et on considère que l'expression à un niveau élevé des chaperons favorise la survie des cellules cancéreuses. Les chaperons sont donc actuellement des cibles thérapeutiques majeures en cancérologie et il a été montré, par exemple, que l'inhibition de Hsp90 ou Hsp27 peut favoriser la mort de cellules leucémiques (Jego et al., 2013). Là encore, certaines protéines DnaJ ont été impliquées dans le développement de cancers (Sterrenberg et al., 2011), comme par exemple DNAJB9/hTid1 qui inhibe la transformation leucémique par STAT5b (Dhennin-Duthille et al., 2011).

#### **IV. Objectifs de mon travail de thèse**

Les facteurs MLF forment donc une petite famille de protéines mal caractérisées et impliquées dans la transformation oncogénique des cellules sanguines. Notre équipe a montré que chez la *Drosophile* MLF contrôle le nombre de cellules à cristaux (un lignage sanguin apparenté aux mégacaryocytes) et le niveau de LZ, un facteur de transcription de type RUNX indispensable à la formation de ce lignage. De plus nos résultats suggèrent que la régulation des RUNX est une caractéristique conservée des protéines MLF qui pourrait donc jouer un rôle dans les nombreux cancers causés par une modification de l'activité des RUNX chez l'homme. **Dans le prolongement de ces travaux, mon projet de thèse utilise donc la *Drosophile Drosophila melanogaster* comme modèle pour caractériser 1) le rôle de MLF dans la régulation de l'homéostasie du système hématopoïétique et en particulier dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation du lignage LZ/RUNX+ et 2) la fonction moléculaire de MLF en caractérisant par quel mécanisme il régule les facteurs RUNX et en identifiant ses partenaires.**

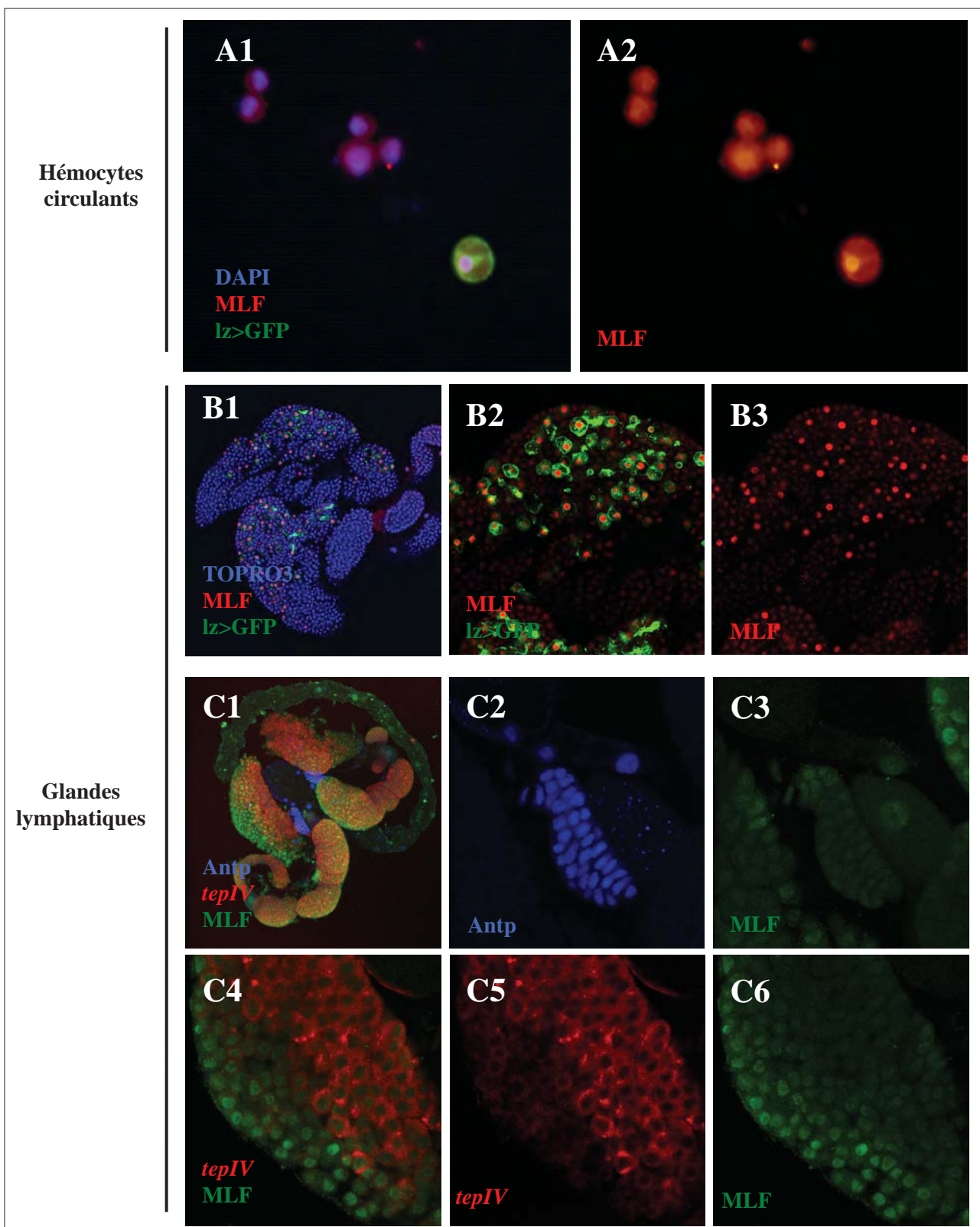
# ***RESULTATS***

# **Partie I : Caractérisation du rôle et du mode d'action de MLF au cours de l'hématopoïèse chez la larve de *Drosophila***

## **I.A. Introduction**

Comme nous l'avons vu précédemment, les résultats obtenus dans l'équipe montrent que MLF contrôle le nombre de cellules à cristaux circulantes de la larve en régulant positivement le niveau d'expression du facteur de type RUNX, LZ. En effet, les larves mutantes pour *mlf* présentent un phénotype de type « myélodysplasique » caractérisé par une augmentation du nombre de cellules LZ+ en circulation sans blocage apparent de leur différenciation en cellules à cristaux. De plus, ce phénotype est accompagné d'une diminution du niveau d'expression de LZ et est sauvé par réexpression de LZ spécifiquement dans le lignage LZ+ (Bras et al., 2012). D'autre part, des observations préliminaires réalisées lors de cette étude suggéraient que MLF participe au maintien des prohémostocytes de la glande lymphatique et contrôle la taille de cet organe. En effet, au troisième stade larvaire (L3), les glandes lymphatiques des larves mutantes pour *mlf* sont hyperplasiques et présentent une diminution de la population de progéniteurs sanguins accompagnée d'une différenciation plus précoce et plus importante en plasmotocytes et cellules à cristaux. **Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour premier objectif de caractériser plus en détail le rôle et le mode d'action de MLF, d'une part, au cours du maintien de l'homéostasie de la glande lymphatique et, d'autre part, au cours du développement des cellules à cristaux circulantes.** Les résultats que j'ai obtenus dans la glande lymphatique montrent que contrairement à ce qui avait été précédemment proposé MLF ne semble pas avoir de rôle majeur lors du développement de cet organe hématopoïétique. A l'inverse, les résultats obtenus en circulation confirment que MLF contrôle le nombre de cellules à cristaux circulantes en modulant le niveau de LZ dans ces cellules. De plus, mes résultats montrent que MLF contrôle aussi leur état de différenciation et que ce phénotype est non seulement sauvé par réexpression de LZ dans le lignage LZ+ mais également observé en contexte hypomorphe *lz*. Afin de poursuivre la caractérisation du rôle et du mode d'action de MLF dans les cellules à cristaux circulantes nous avons établi leur transcriptome chez des larves sauvages ou mutantes pour *mlf*. Cette approche a permis de mettre en évidence que MLF a un rôle majeur dans ce lignage hématopoïétique puisque plus d'un quart des gènes spécifiques de





**Figure 22 : MLF est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules hématopoïétiques larvaires.**

Profil d'expression de MLF dans les hémocytes circulants (A) et la glande lymphatique (B,C) de larves *lz:GAL4,UAS:mCD8-GFP/+* (A,B; lz>GFP) ou sauvages (C) au troisième stade de développement (L3). (A) Le marquage en immunofluorescence de MLF dans les hémocytes circulants montre que cette protéine est exprimée fortement dans le lignage lz>GFP+ et à plus faible niveau dans le reste des hémocytes. (B,C) Dans la glande lymphatique, MLF est fortement exprimé dans le lignage lz>GFP+ (B-B2). MLF est aussi exprimé dans le PSC (marqué par Antp, C1-C3) ainsi qu'au niveaux des prohématocytes (marqués par l'expression de *tepIV*, C1, C4, C5) et des hémocytes différenciés (*tepIV*-; C1, C4, C6). B2, B3 : agrandissements de B1 ; C2-C6 : agrandissements de C1. Le DAPI (A) ou le Topro3 (B) sont utilisés pour visualiser les noyaux des cellules.

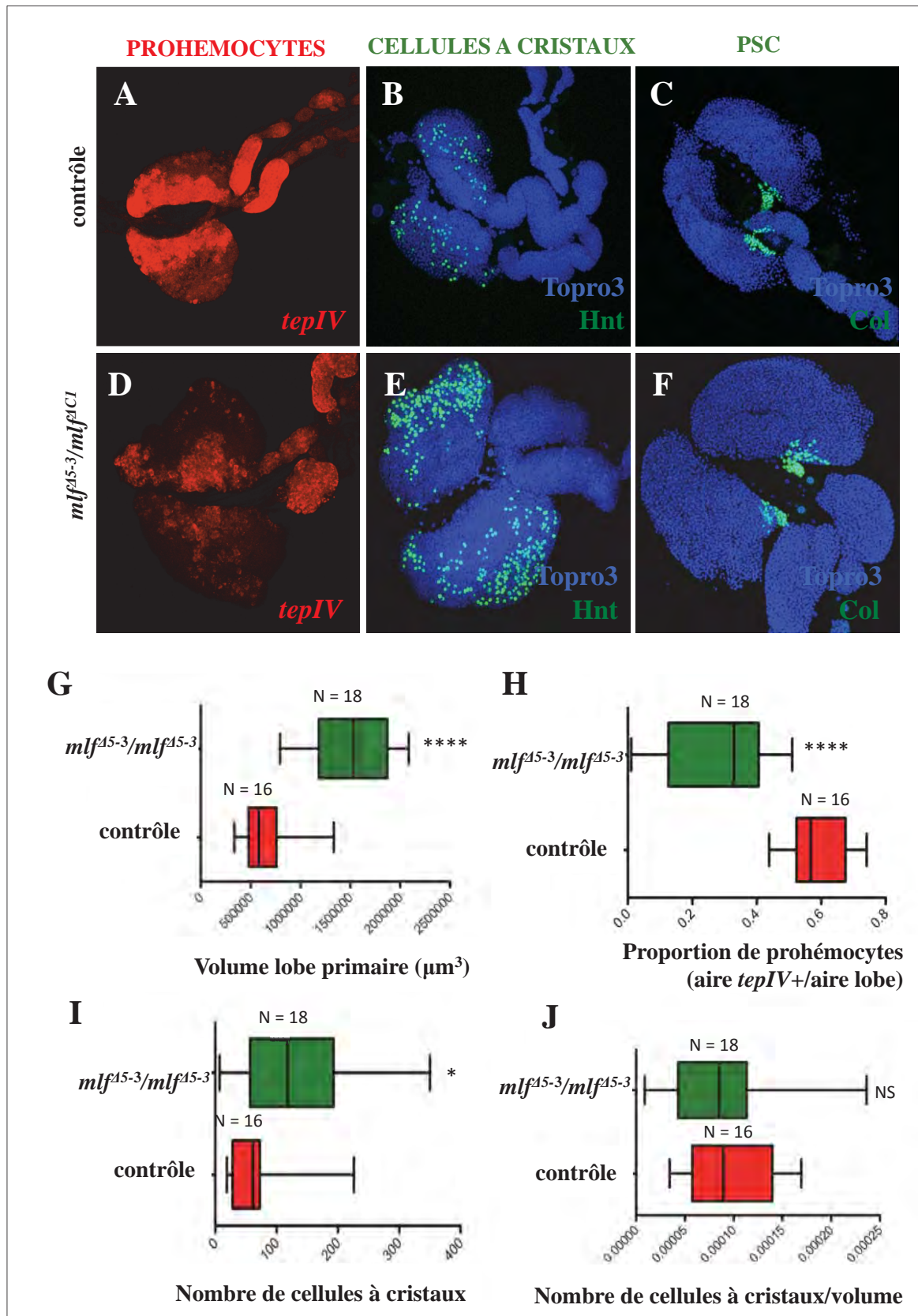
ce lignage sont dérégulés en son absence. Enfin, les résultats que j'ai obtenus en parallèle de cette approche transcriptomique montrent que la voie de signalisation Notch est suractivée dans les cellules à cristaux circulantes des larves mutantes pour *mlf* ou hypomorphes pour *lz*, suggérant que les phénotypes associés à une diminution du niveau de LZ pourraient être dus à la dérégulation de la voie Notch. Ainsi, mes résultats mettent en exergue l'importance de la régulation du niveau du facteur RUNX LZ par MLF pour le développement normal des cellules sanguines et laissent entrevoir des parallèles intéressants avec le développement des leucémies chez l'Homme.

## **I.B. Résultats**

Afin de caractériser plus précisément le rôle de MLF au cours de l'hématopoïèse larvaire, j'ai commencé par réexaminer, par immunofluorescence, son profil d'expression. J'ai ainsi pu montrer que MLF est ubiquitairement exprimé dans les cellules hématopoïétiques chez la larve L3. En effet, en plus d'être exprimé fortement dans le lignage LZ+ circulants (**Figure 22 A-A1**) et de la glande lymphatique (**Figure 22 B-B3**), MLF est exprimée, à plus faible niveau, dans l'ensemble des hémocytes circulants (**Figure 22 A-A1**) ainsi que dans toutes les cellules de la glande lymphatique (**Figure 22 C**) : dans les prohémyocytes de la zone médullaire et des lobes secondaires (**Figure 22 C**), dans les cellules différenciées de la zone corticale (**Figure 22 C5**) ainsi que dans les cellules du PSC (**Figure 22 C2**). De plus, MLF semble principalement nucléaire dans l'ensemble de ces types cellulaires et, au niveau de la glande lymphatique, son niveau d'expression apparaît plus élevé dans les cellules différenciées que dans les prohémyocytes (**Figure 22 C5**). La spécificité du marquage obtenu avec cet anticorps a été confirmée par immunofluorescence sur des glandes lymphatiques de larves mutantes pour *mlf* (cf. **Figure 24 G**).

### **I.B.1. Caractérisation du rôle de MLF dans la glande lymphatique**

J'ai ensuite cherché à mieux caractériser le rôle de MLF dans la glande lymphatique. En accord avec les résultats préliminaires obtenus au laboratoire, les quantifications que j'ai réalisées montrent que les larves transhétérozygotes mutantes pour *mlf*, (*mlf<sup>Δ5-3</sup>/mlf<sup>ΔC1</sup>*) présentent des lobes primaires significativement plus gros que celles des larves contrôles (**Figure 23G**). Des expériences d'hybridation *in situ* contre le marqueur des prohémyocytes *tepIV* indiquent que cette hyperplasie des lobes primaires est associée à une diminution



**Figure 23 : Etude du rôle de *mlf* dans la glande lymphatique.**

(A-F) Hybridation *in situ* contre le marqueur des prohémyocytes *tepIV* (A et D) et immunofluorescence contre le marqueur des cellules à cristaux Hnt (B et E) ou du PSC Col (C et F) dans des glandes lymphatiques de larves L3 sauvages (A-C) ou mutantes pour *mlf* (D-F). Le *topro3* est utilisé pour visualiser les noyaux des cellules (B, C, E et F). (G-J) Quantifications du volume des lobes primaires (G), de la proportion de prohémyocytes (H), du nombre de cellules à cristaux par lobe en valeur absolue (I) ou rapporté au volume du lobe correspondant (J). N indique le nombre d'échantillons analysés.

d'environ deux fois de la proportion de progéniteurs sanguins présents dans les lobes primaires ainsi qu'à une réduction du niveau d'expression de ce gène dans les lobes postérieurs (**Figure 23 A, D et H**). Mes résultats montrent également que l'expression de COL, marqueur du PSC, ne semble pas affectée (**Figure 23 C, F**), suggérant donc que la diminution de la population de prohémyocytes n'est pas due à un défaut de spécification du PSC. D'autre part, l'analyse de l'expression du marqueur des cellules à cristaux HNT (**Figure 23 B,E**), m'a permis de révéler que bien qu'il y ait une augmentation du nombre absolu de ces cellules dans les glandes lymphatiques des larves mutantes pour *mlf*, cette augmentation n'est pas significative une fois rapportée à la taille des lobes (**Figure 23 I, J**). Ainsi, ces premiers résultats suggéraient fortement que MLF jouait un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie de la glande lymphatique. Cependant, des expériences complémentaires m'ont amenée à suggérer que ces phénotypes n'étaient pas dus à la perte de *mlf* mais à la présence de mutations secondaires, et ce sur les deux allèles mutants pour *mlf* dont nous disposions !

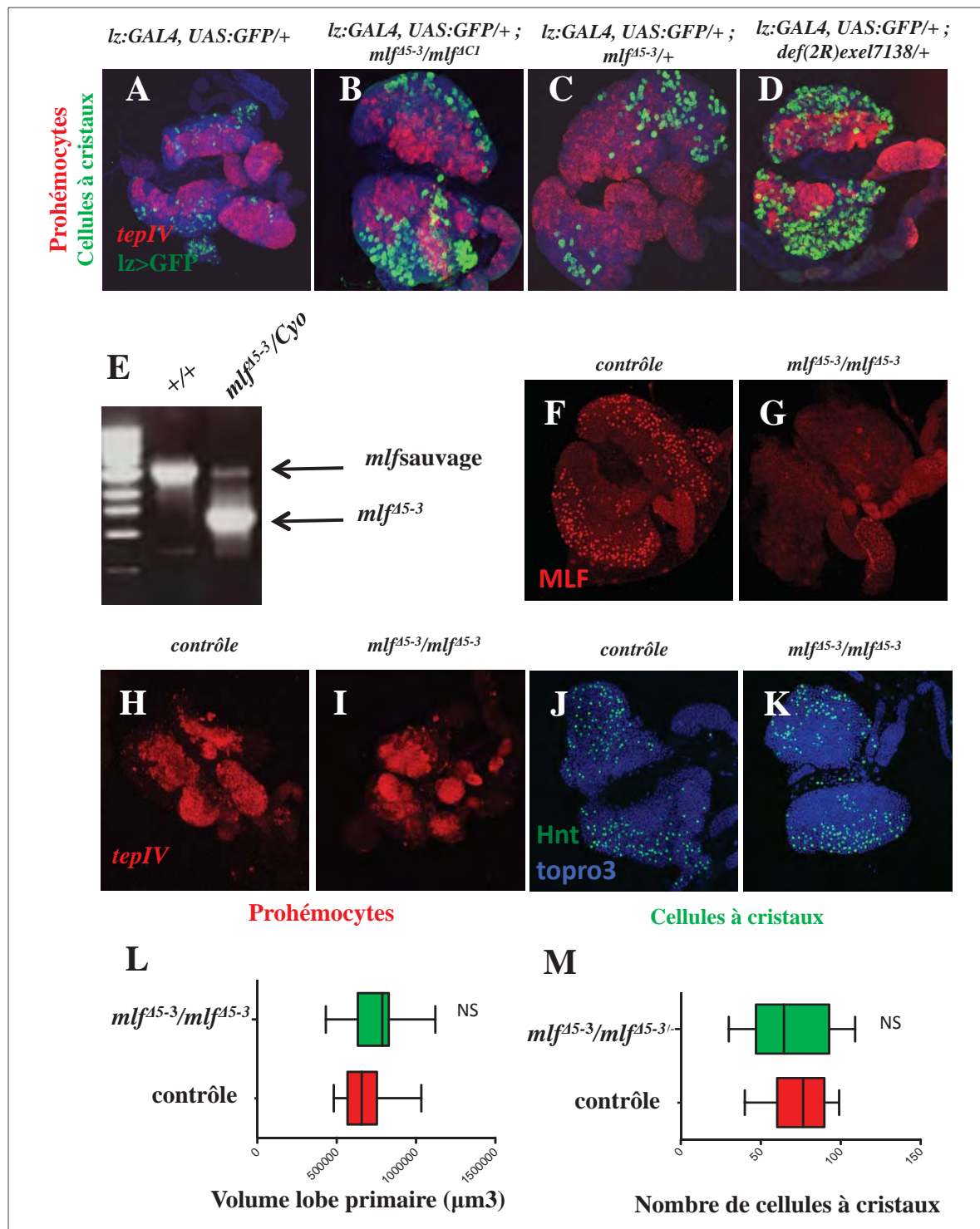
En effet, j'ai observé que ces phénotypes sont présents dans les glandes lymphatiques des larves mutantes pour *mlf* aussi bien en contexte transhétérozygotes *mlf<sup>Δ5-3</sup>/mlf<sup>ΔC1</sup>* (**Figure 24 B**) qu'en contexte hétérozygote *mlf<sup>Δ5-3</sup>/+* (**Figure 24 C**) ou *mlf<sup>ΔC1</sup>/+* (non montré) alors qu'ils sont absents en contexte hémizygote (utilisation d'une déficience couvrant *mlf*: Df(2R)Exel7138/+) (**Figure 24 D**). J'ai donc entrepris le « nettoyage » du chromosome mutant portant la délétion *mlf<sup>Δ5-3</sup>* en croisant, sur trois générations successives, des Drosophiles femelles portant cet allèle avec des Drosophiles sauvages (souche *w<sup>1118</sup>*). J'ai ensuite sélectionné les Drosophiles mutantes pour *mlf* par PCR (**Figure 24 E**) et validé l'absence de MLF par immunofluorescence dans la glande lymphatique (**Figure 24 F, G**). La caractérisation des glandes lymphatiques dans 2 lignées indépendantes de mouches mutantes pour *mlf* ainsi obtenues m'a ensuite permis de montrer que ni la population de prohémyocytes, ni la taille de la glande lymphatique, ni le nombre de cellules à cristaux ne sont affectés par la perte de *mlf* (**Figure 24 H-M**).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que, malgré son expression ubiquitaire dans la glande lymphatique, *mlf* ne semble pas jouer de rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de cet organe hématopoïétique.

## **I.B.2. Caractérisation du rôle et du mode d'action de MLF dans les cellules circulantes chez la larve**

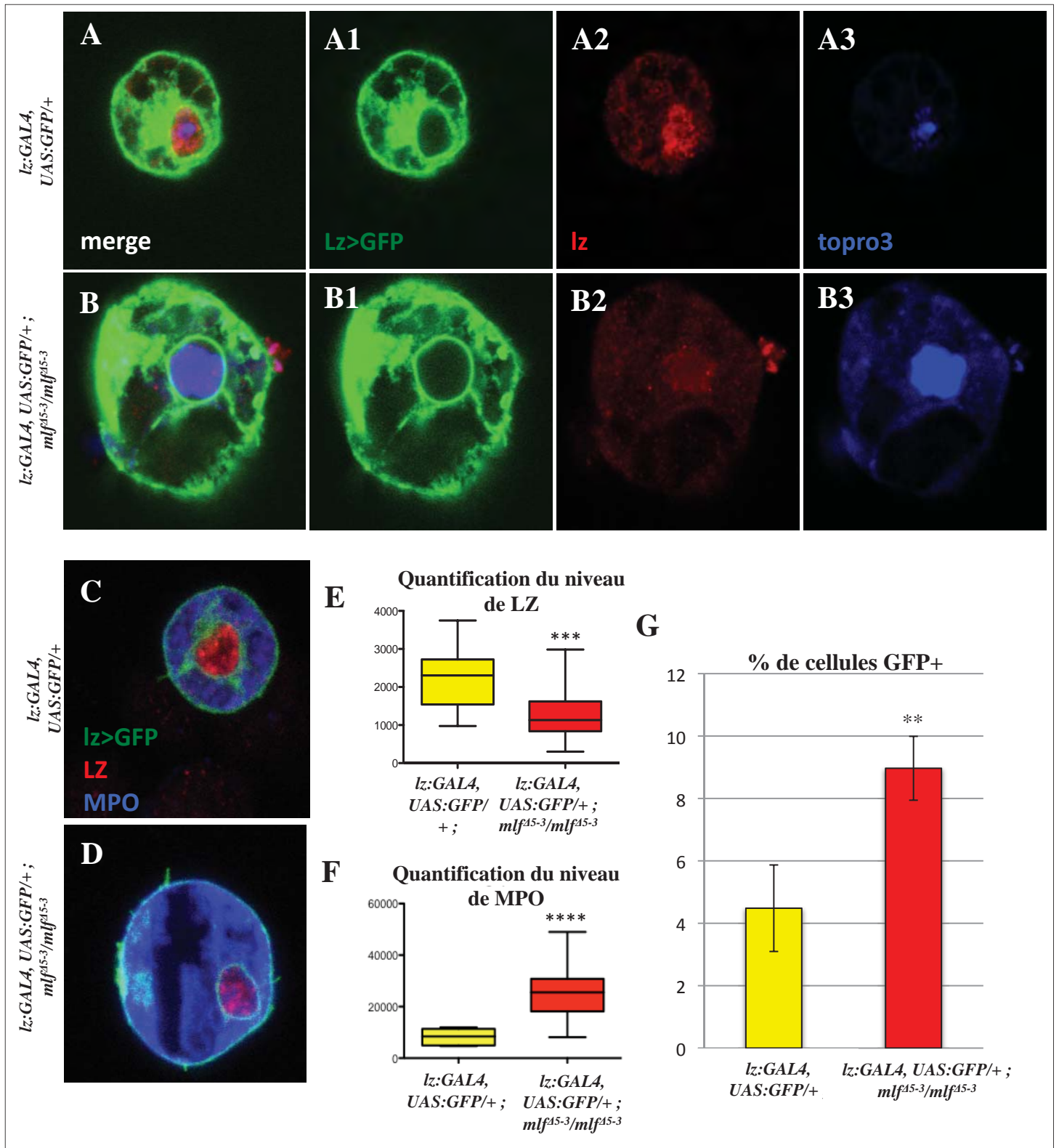
### **I.B.2.a. MLF contrôle le nombre et l'état de différenciation**





**Figure 24 : *mlf* n'a pas de rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie de la glande lymphatique.**

(A-D) Hybridation *in situ* contre *tepIV* et immunomarquage contre la GFP dans des glandes lymphatiques de larves L3 des génotypes indiqués. (E-M) Nettoyage du chromosome mutant *mlf<sup>Δ5-3</sup>* et analyse des phénotypes associés. (E) Exemple de résultat de PCR sur de l'ADN génomique de lignées de Drosophiles sauvages ou hétérozygotes pour la délétion *mlf<sup>Δ5-3</sup>* et (F-G) d'immunofluorescence contre MLF dans des glandes lymphatiques de larves sauvages ou « nettoyées » *mlf<sup>Δ5-3</sup>/mlf<sup>Δ5-3</sup>*. (H-I) Hybridation *in situ* contre *tepIV* ou immunofluorescence contre Hnt (J-K) dans des glandes lymphatiques de larves sauvages (H et J) ou mutantes « nettoyées » pour *mlf* (I et K). (J-K) Le top3 est utilisé pour visualiser le noyaux des cellules. (L-M) Quantification du volume des lobes primaires (L) et du nombre de cellules à cristaux par lobe primaire (M) dans des glandes lymphatiques de larves sauvages ou mutantes pour *mlf*.



**Figure 25 : MLF contrôle la différenciation des cellules à cristaux circulantes chez la larve.**

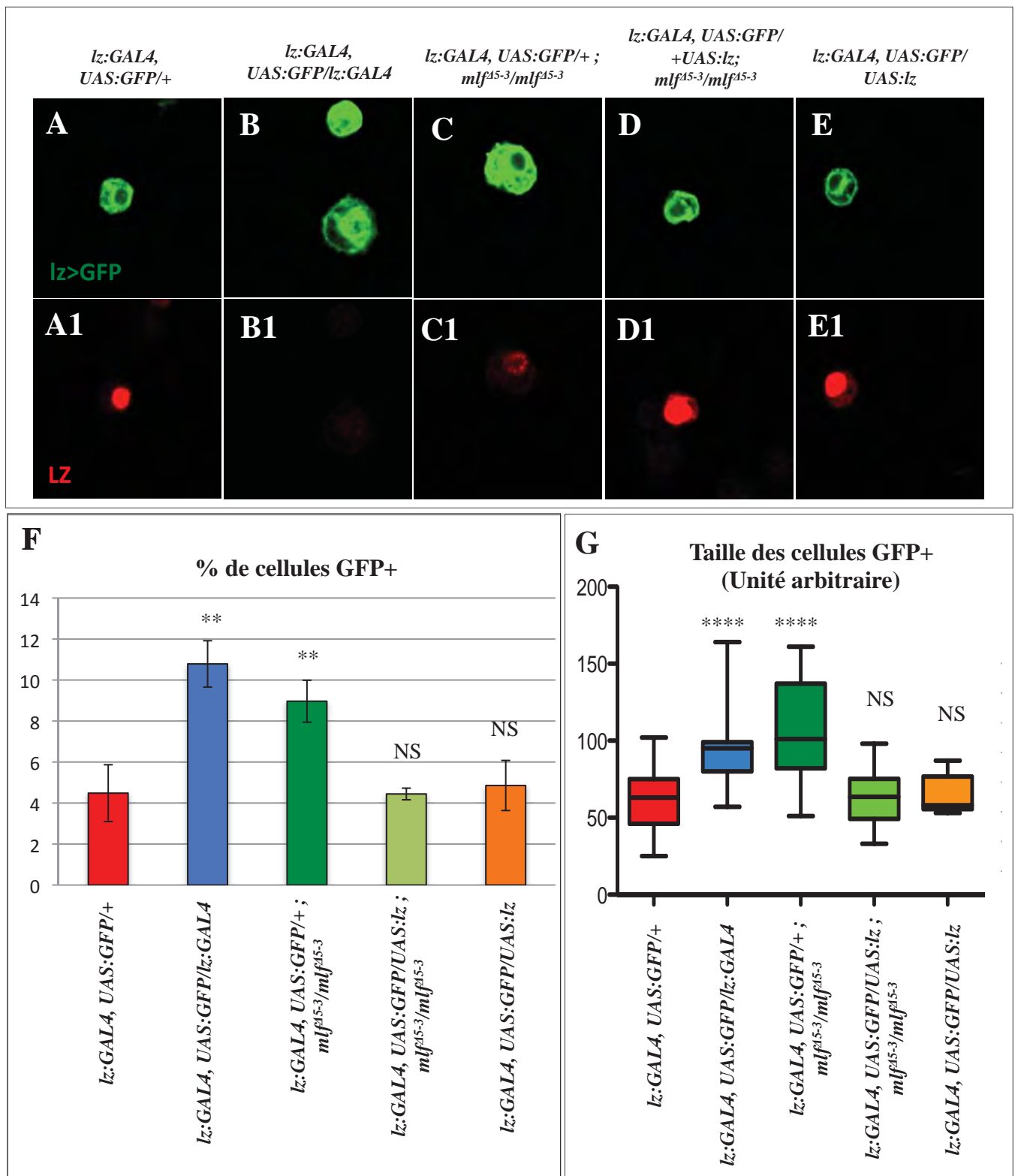
(A-D) L'expression de LZ (A-B) et MPO (C-D) dans les cellules à cristaux (*lz>GFP*+) circulantes de larves de stade L3 a été analysée par immunofluorescence. (E-G) Quantification du niveau d'expression LZ (E) ou MPO (F) dans les cellules *lz>GFP*+, et du pourcentage de cellules *lz>GFP*+ présentes par rapport aux hémocytes totaux DAPI+ (G).

## des cellules à cristaux circulantes en régulant positivement le niveau de LZ

Suite au « nettoyage » du chromosome *mlf*<sup>45-3</sup>, j'ai re-caractérisé les phénotypes hématopoïétiques au niveau des cellules circulantes des larves mutantes pour *mlf* mais qui ne présentent plus de défauts apparents au niveau de la glande lymphatique. Comme précédemment décrit (Bras et al., 2012), les larves mutantes pour *mlf* présentent une diminution du niveau de LZ dans les cellules *lz*>GFP+ en circulation (**Figure 25 A-B2 et E**) associé à une augmentation de leur nombre (**Figure 25G**). De plus, mes résultats montrent que différents traits caractéristiques des cellules à cristaux différenciées sont exacerbés dans une forte proportion des cellules LZ+ des larves mutantes pour *mlf* suggérant qu'elles sont anormalement différenciées (ou « hyper-différenciées »). En effet, j'ai pu mettre en évidence une augmentation de la taille de ces cellules (**Figure 25 A et B**) et également pu observer une augmentation de la taille de leurs noyaux (**Figure 25 A3 et B3**), suggérant une augmentation du niveau d'endoréplication (Terriente-Felix et al., 2013), la présence de cristaux cytoplasmiques plus grands (**Figure 25 A1 et B1**) ainsi qu'une augmentation du marquage contre la prophénoloxidas PPO45/MPO (**Figure 25 C, D et F**). Ces phénotypes sont également observés dans des larves *mlf*<sup>45-3</sup>/*mlf*<sup>45-3</sup> dans lesquelles la présence des cellules à cristaux est révélée par l'expression du rapporteur Bc:GFP (Gajewski et al., 2007) ou par un immunomarquage contre Hnt (**non montré**). Ces phénotypes ne résultent donc pas d'une interaction génétique entre *mlf* et la lignée enhancer trap *lz*<sup>GAL4</sup> utilisée (à l'état hétérozygote) pour visualiser les cellules sanguines du lignage LZ+ (cf. ci-dessous).

De plus, l'ensemble de ces phénotypes est sauvé par réexpression de LZ spécifiquement dans les cellules LZ+, grâce au pilote d'expression *lz*:*GAL4* combiné au transgène *UAS:lz* ((*lz*>GFP>*lz*; *mlf*<sup>45-3</sup>/*mlf*<sup>45-3</sup>) (**Figure 26**), suggérant fortement qu'en contrôlant positivement le niveau de LZ dans le lignage LZ+, *mlf* régule à la fois le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes larvaires. Confortant cette hypothèse, ces phénotypes sont également retrouvés dans les cellules à cristaux circulantes issues de larves hypomorphe *lz*. En effet, des mouches homozygotes pour l'enhancer trap *lz*<sup>GAL4</sup>, présentent une diminution drastique du niveau de LZ dans les cellules à cristaux circulantes (**Figure 26 B, B1**) associée à une augmentation de leur nombre (**Figure 26 F**) ainsi qu'à une augmentation de la taille de ces cellules (**Figure 26 G**). Des phénotypes similaires sont observés dans des larves hémizygot *lz*<sup>GAL4</sup> ou transhétérozygotes *lz*<sup>GAL4</sup>/*lz*<sup>R1</sup>, autres contextes génétiques hypomorphes pour *lz* (**non montré**). Il est également important de





**Figure 26 : MLF et LZ contrôlent le nombre et la taille des cellules à cristaux circulantes chez la larve.**

Les larves des génotypes indiqués ont été saignées au troisième stade de développement afin d'évaluer par immunofluorescence le niveau de LZ dans les cellules *lz>GFP+* (A-E), la proportion de cellules *lz>GFP+* par rapport aux hémocytes totaux (DAPI+) (F), ainsi que la taille des cellules *lz>GFP+* (G).

souligner ici que la surexpression de LZ ( $l_z > GFP > l_z$ ) n'a quant à elle ni d'effet sur le nombre ni sur la taille des cellules LZ+ (**Figure 26 E, F, G**). Ainsi, paradoxalement, alors que  $l_z$  est requis pour le développement du lignage des cellules à cristaux (elles sont absentes dans un contexte mutant nul tel que  $l_z^{R1}/l_z^{R1}$ ), une diminution de son expression s'accompagne d'une augmentation du nombre de ces cellules qui semblent également « hyper-différenciées ».

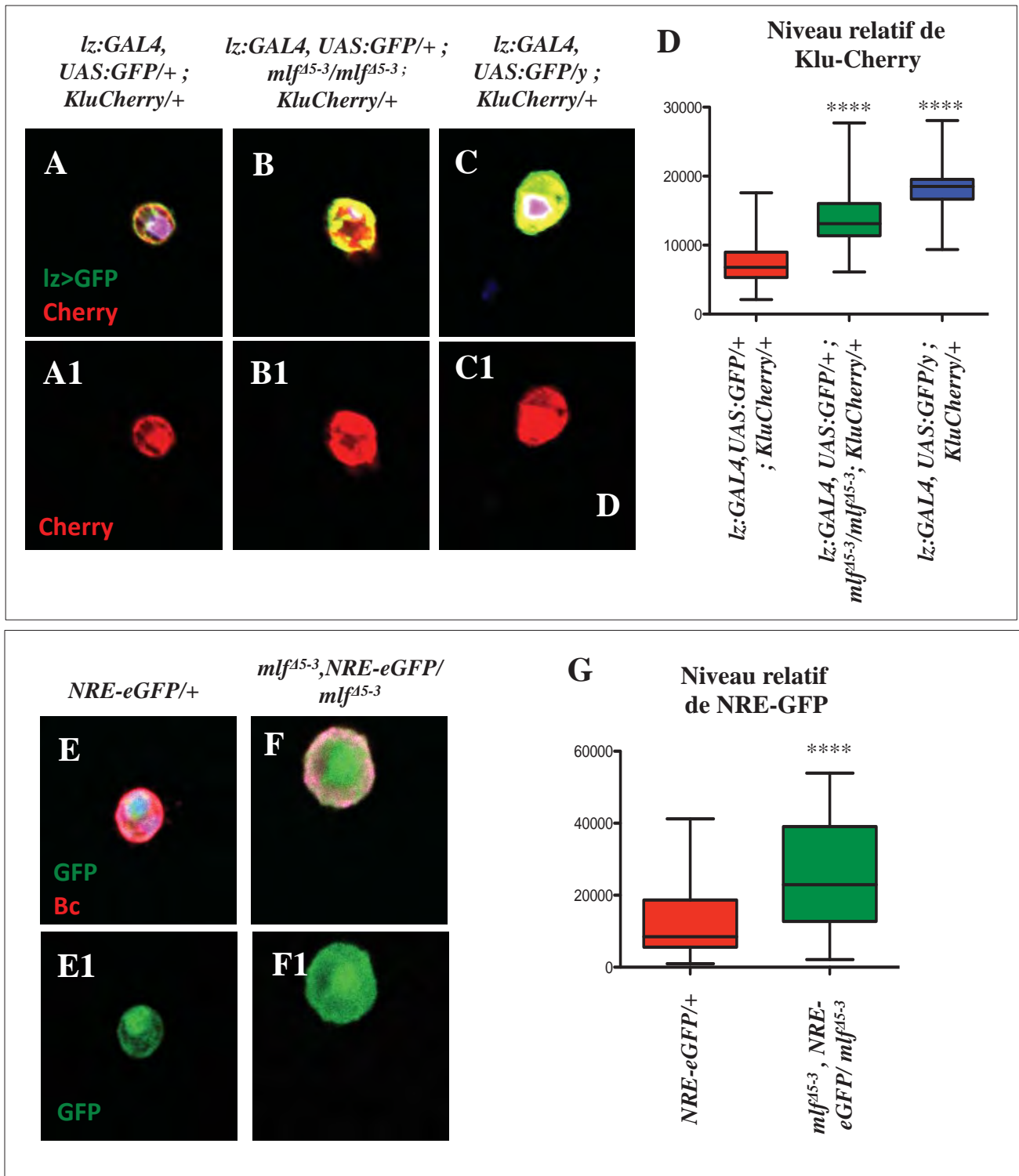
Pour terminer, il est à noter que j'ai également analysé le second type d'hémocytes différenciés présent en circulation chez la larve : les plasmacytes, qui représentent  $\pm 90\%$  des cellules sanguines. Bien que MLF soit exprimé à faible niveau dans ces cellules (**Figure 22 A, A1**), je n'ai pas observé de défaut de différenciation de ce lignage chez des larves mutantes pour *mlf* avec les marqueurs dont nous disposons et leur nombre n'est pas non plus affecté (**non montré**).

L'ensemble de ces résultats indique donc qu'en circulation chez la larve L3 MLF ne semble pas avoir de rôle majeur dans les plasmacytes mais qu'il contrôle à la fois le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes en modulant le niveau de LZ.

#### **I.B.2.b. MLF contrôle la signalisation Notch dans les cellules à cristaux**

Il a été montré que la voie Notch contrôle d'une part le nombre de cellules à cristaux (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003; Mukherjee et al., 2011) et d'autre part leur état de différenciation (Terriente-Felix et al., 2013). L'augmentation du nombre et de l'état de différenciation des cellules à cristaux observé en absence de *mlf* ou en contexte hypomorphe pour  $l_z$  pourrait s'expliquer par une activité accrue de cette voie de signalisation dans le lignage LZ+. Pour tester cette hypothèse, j'ai analysé l'expression du gène rapporteur *klumpfuss:Cherry*, qui est activé par cette voie dans le lignage des cellules à cristaux (Terriente-Felix et al., 2013). De façon intéressante, j'ai observé une augmentation de l'expression de ce rapporteur dans les cellules à cristaux de larves mutantes pour *mlf* ou hypomorphe pour  $l_z$  ( $l_z^{GALA}/Y$ ) (**Figure 27 A-D**). Afin de confirmer ce résultat, j'ai aussi analysé l'expression d'un rapporteur « générique » de la voie Notch : *NRE:GFP* (Housden et al., 2012). Là encore, j'ai pu observer une augmentation de l'expression de ce rapporteur dans les cellules à cristaux de larves mutantes pour *mlf* par rapport au contrôle (**Figure 27 E-G**).

Cette suractivation de la voie de signalisation Notch en contexte mutant pour *mlf* ou hypomorphe pour  $l_z$  indique donc, d'une part, un effet inhibiteur de MLF et LZ sur cette voie



**Figure 27 : MLF agit comme un régulateur négatif de la voie de signalisation Notch dans les cellules à cristaux circulantes.**

(A-E) Les larves des génotypes indiqués ont été saignées au troisième stade de développement afin d'évaluer par immunofluorescence l'expression des rapporteurs de la voie Notch Klu-Cherry (A-C) et NRE-GFP (E, F) dans les cellules à cristaux, marquées par l'expression de *lz>GFP* (A, B, C) ou de *Bc* (E, F) et quantification relative des niveaux d'expression de Klu-Cherry (D) ou NRE-GFP (G) dans les cellules à cristaux dans ces différents contextes.

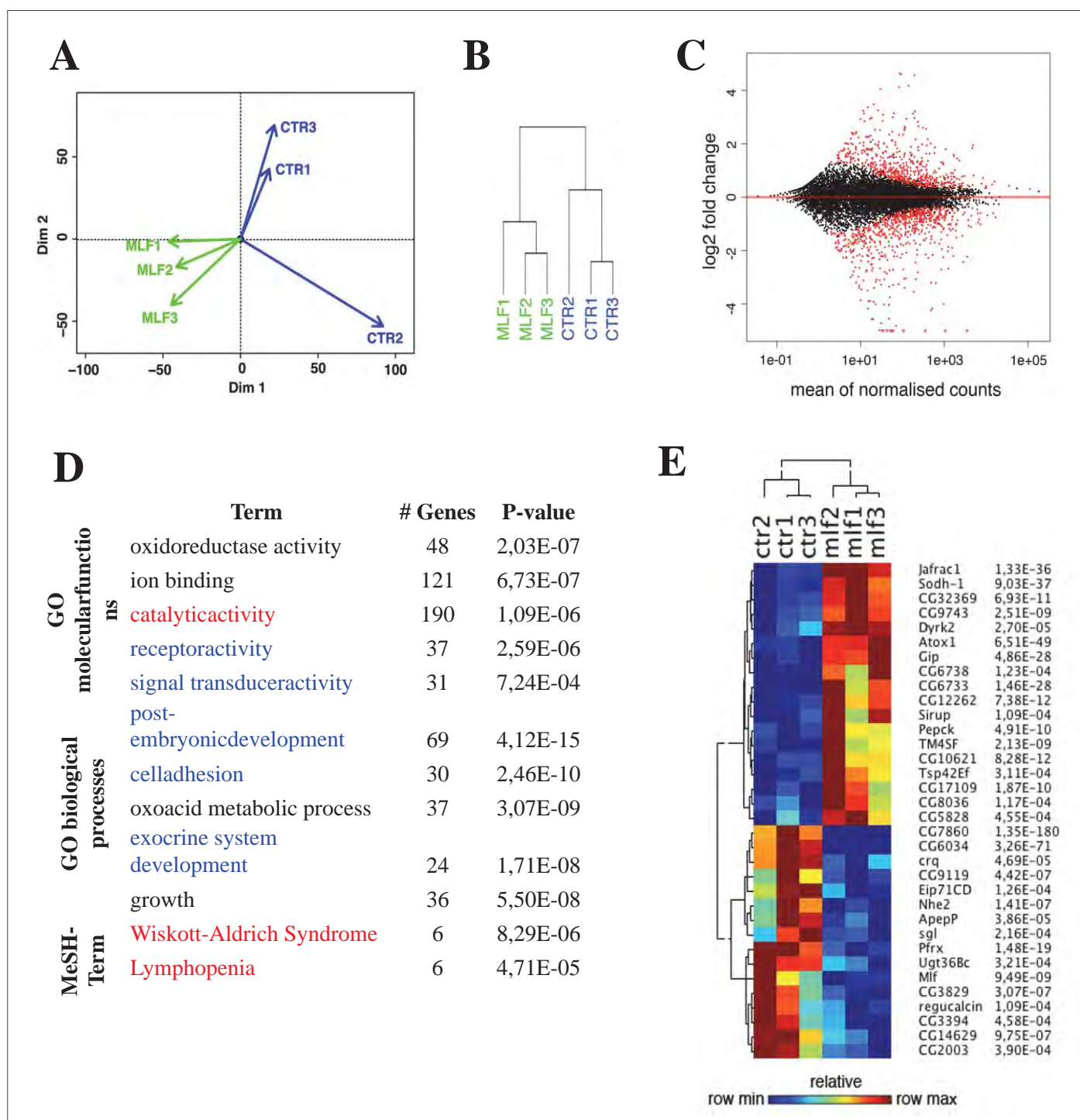
et suggère d'autre part, que les phénotypes observés dans ces contextes pourraient être du à la suractivation de la voie Notch dans ces cellules. Il serait donc particulièrement intéressant de tenter de sauver les phénotypes causés par *mlf* en diminuant la dose/l'activité de Notch dans ces cellules.

### **I.B.2.c Caractérisation de la fonction de MLF dans les cellules à cristaux circulantes chez la larve : approche transcriptomique**

Dans le but d'avoir une vision globale des réseaux géniques dérégulés par *mlf* dans le lignage des cellules à cristaux et de pouvoir éventuellement mieux comprendre l'origine des phénotypes que nous observons, nous avons décidé d'établir par RNAseq le transcriptome des cellules LZ+ circulantes dans les larves L3 sauvages ou mutantes pour *mlf*.

Pour réaliser cette expérience, j'ai mis au point les conditions permettant de récupérer spécifiquement la population LZ+ de cellules sanguines (*i.e.*  $\pm 5\%$  des hémocytes) par FACS à partir de saignées de larves portant un transgène *lz>GFP*. J'ai validé ce protocole de tri par des expériences d'immunofluorescence et de RT-qPCR sur les cellules ainsi triées (**non montré**). Afin d'obtenir des quantités d'ARN suffisantes, nous avons saigné une centaine de larves par échantillon et des triplicats biologiques ont été préparés pour chacune des deux conditions (contrôle *lz>GFP/+* et mutant : *lz>GFP/+;mlf/mlf*). Ces ARNs ont ensuite été analysés par RNAseq à la plateforme NGS de l'Université de Michigan (USA).

Un premier intérêt de cette approche RNAseq est qu'elle offre une vision à l'échelle du génome des gènes exprimés dans le lignage des cellules à cristaux circulantes. Bien que la profondeur de séquençage que nous ayons obtenu soit assez faible (de l'ordre de 7 millions de séquences uniques cartographiées pour les échantillons sauvage et 17 millions pour les échantillons mutants), probablement du fait de la quantité limité de matériel dont nous sommes partis, sur les 15682 gènes annotés dans la version BDGP R5 du génome de *Drosophile*, l'expression de 7399 d'entre eux est détectée dans chacun des 6 échantillons séquencés. On peut remarquer que les 2 gènes les plus fortement exprimés dans les cellules à cristaux sont *Bc*, *mpo* avec des FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped) supérieurs à 100000 ! C'est la première fois que le profil d'expression d'un lignage sanguin de la *Drosophile* est établi et il serait intéressant de pouvoir le comparer au profil des autres populations d'hémocytes.



**Figure 28 : MLF est un régulateur majeur de l'expression génique des cellules à cristaux.**

(A-B) Analyses en composantes principales (A) et dendrogramme (B) des données de RNAseq des 6 échantillons de cellules lz-GFP<sup>+</sup> circulantes de larves L3 (CTR: *lz>GFP/+*; MLF: *lz>GFP/+*; *mlf<sup>6CS/mlf<sup>6CS</sup></sup>*). (C) Représentation des données d'expression entre échantillons contrôles et mutants pour *mlf*. Les gènes différentiellement exprimés ( $P < 10^{-3}$ ) sont représentés par des points rouges. (D) Principaux termes GO (Gene Ontology) ou MESH (Medical Subject Headings) sur-représentés dans la liste des 518 gènes différentiellement régulés. Les catégories pour lesquelles les gènes activés ou réprimés sont les principaux contributeurs sont indiqués en rouge ou bleu, respectivement. (E) Clustering hiérarchique et données d'expression relative des 32 gènes spécifiques des cellules à cristaux et significativement dérégulés dans les cellules à cristaux des larves mutantes pour *mlf*. Le nom des gènes et la P-value sont indiqués à droite.

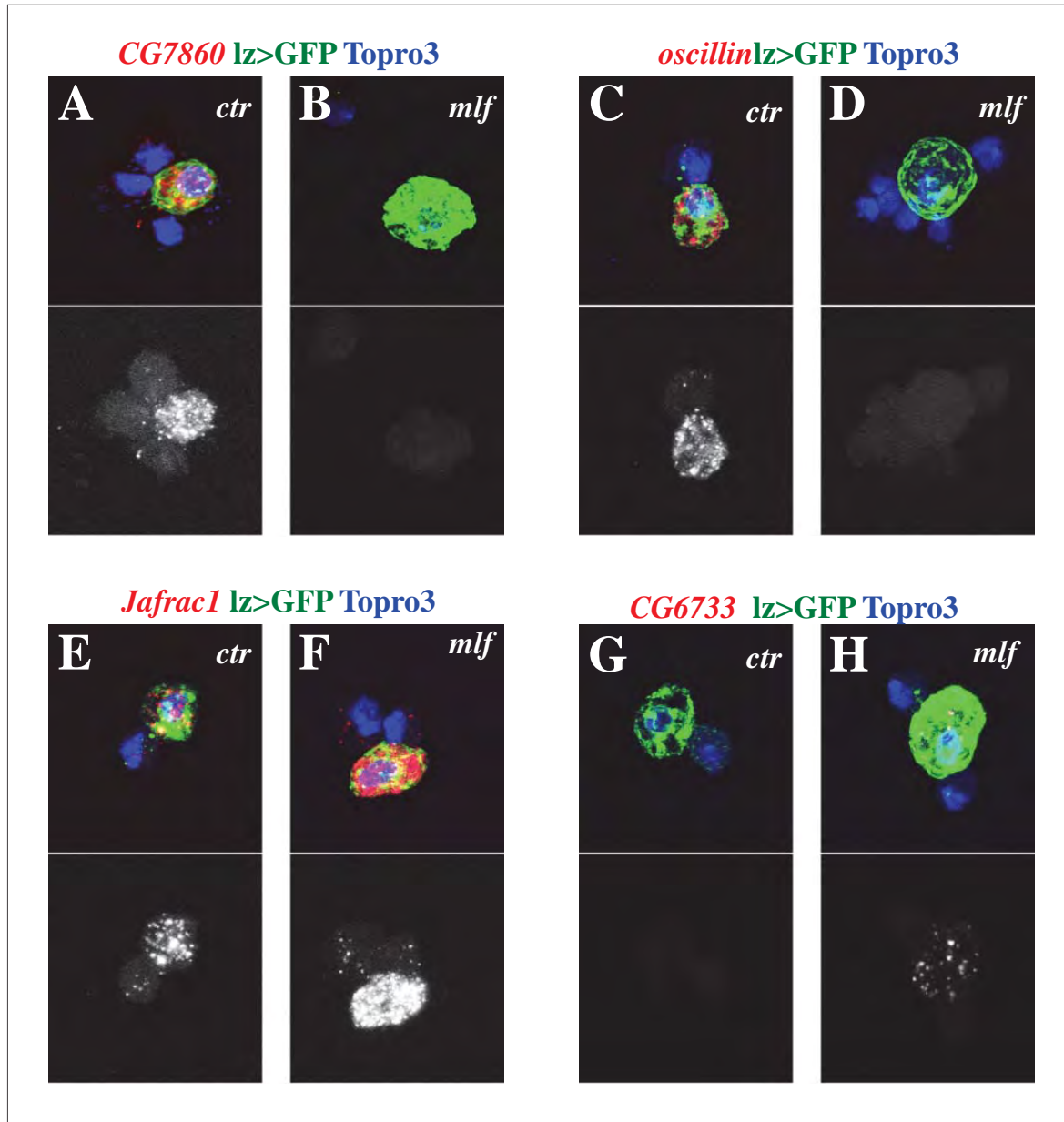
D'autre part, des analyses en composantes principales de l'ensemble des gènes détectés comme exprimés dans les 6 échantillons (**Figure 28 A, B**) montrent que les échantillons sauvages et mutants sont plus semblables entre eux qu'avec les échantillons mutants et vice versa. L'analyse statistique de ces données d'expression avec la suite DEseq2 indique que près de 518 gènes sont exprimés de façon différentielle entre les cellules à cristaux sauvages et mutants pour *mlf* (avec une valeur de P ajustée par FDR inférieure à 0,01 et une différence d'expression supérieure à 1,5 fois) (**Figure 28 C**). Parmi ceux ci, 322 sont réprimés et 196 sont activés en absence de *mlf*. Une analyse GO (Gene Ontology) montre que la perte de *mlf* induit une répression de l'expression de gènes impliqués dans la transduction du signal, l'adhésion ou le développement larvaire, et l'activation de gènes dont les produits ont une activité catalytique (**Figure 28 D**). De plus, on observe une sur-représentation de gènes associés à une activité oxydoréductase et/ou au métabolisme des oxoacides, suggérant que la perte de *mlf* s'accompagne d'une modification du statut redox des cellules à cristaux.

Une compilation de l'analyse des données d'hybridation *in situ* à grand échelle réalisées dans l'embryon (<http://insitu.fruitfly.org>), des annotations présentes dans Flybase et de données bibliographiques nous a permis d'établir une liste de 128 gènes « visiblement » exprimés dans les cellules à cristaux (principalement sur la base de résultats acquis au stade embryonnaire). Nos données de RNAseq montrent qu'au moins 119 d'entre eux sont exprimés dans les cellules à cristaux circulantes larvaires, dont 69 à un niveau élevé (FPKM>50). De plus, 28% (34/119) sont différentiellement exprimés dans les cellules à cristaux des larves mutantes pour *mlf* (**Figure 28 E**), mettant ainsi en évidence le rôle majeur de MLF au cours du développement de ces cellules.

Pour confirmer et obtenir une vision à l'échelle de la cellule unique, l'expression de certains de ces gènes a été analysée par hybridation *in situ* fluorescente sur des saignées de larves contrôle ou mutantes pour *mlf* (**Figure 29**). Ainsi, j'ai pu confirmer que *CG7860*, *oscillin* et *jafrac1* sont exprimés spécifiquement dans les cellules lz>GFP+ circulantes larvaires. En accord avec les données de RNAseq, l'expression de *CG7860* ou d'*oscillin* dans ces cellules diminue fortement dans un contexte mutant pour *mlf* alors que celle de *Jafrac1* augmente et que *CG6733* est induit ectopiquement dans les cellules à cristaux en absence de *mlf*.

Ces données montrent que *mlf* est requis pour l'expression normale d'un grand nombre de gènes dans le lignage des cellules à cristaux et suggèrent qu'il pourrait influencer le statut redox de ces cellules.

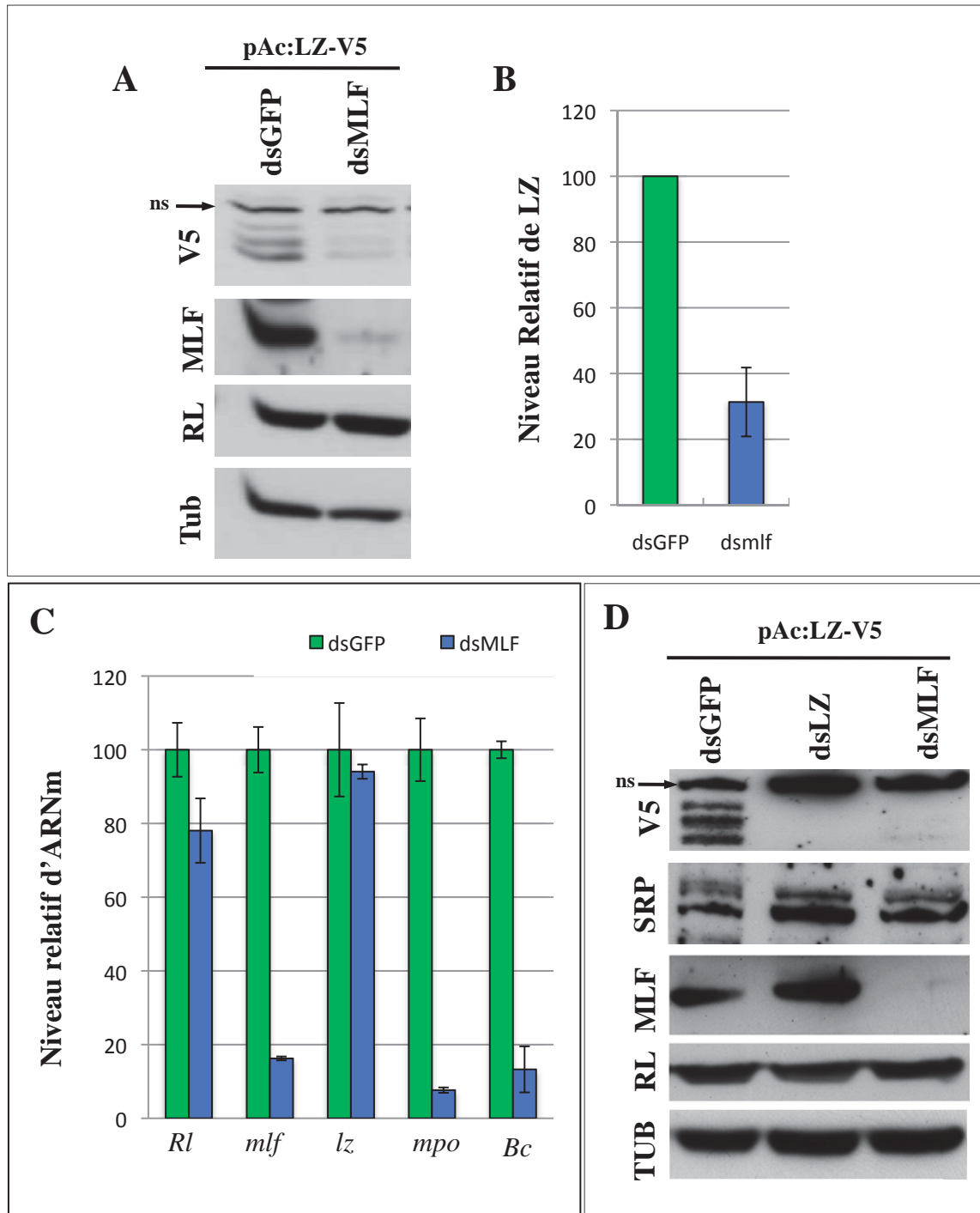




**Figure 29 : MLF contrôle l'expression de différents gènes dans les cellules à cristaux.**

Hybridation *in situ* contre *CG7860* (A,B), *oscillin*(C,D), *Jafrac1* (E,F)et *CG6733* (G,H) et immunomarquage contre la GFP (*lz>GFP*) dans les hémocytes circulants des larves L3 contrôles (*ctr: lz::GAL4,UAS-GFP/+*) ou mutantes pour *mlf* (*mlf: lz::GAL4,UAS-GFP/+; mlf<sup>65C</sup>/mlf<sup>65C</sup>*). Le panel inférieur montre uniquement le canal rouge. Le Topro3 est utilisé pour visualiser les noyaux des cellules.





**Figure 30 : MLF régule le niveau d'expression de LZ en agissant au niveau post-transcriptionnel** (A-D) Des cellules Kc167 ont été cotransfectées avec les vecteurs pAc:LZ-V5 et pAc-RL (RenillaLuciferase) et traités avec des dsRNA ciblant la *GFP*, *mlf* ou *lz* comme indiqué. (A, D) Western-blots montrant que la déplétion de MLF par RNAi entraîne une diminution du niveau de LZ-V5 (révélé avec un anti-V5) (A,D) mais pas de SRP (D). La tubuline endogène (Tub) et la RenillaLuciferase (RL) sont utilisés en contrôle de charge et de transfection respectivement. ns: bande non spécifique. (B) Quantification du niveau relatif de LZ (normalisé par RL) sur différents western-blots. (C) qRT PCR montrant que la déplétion de MLF par RNAi diminue les ARNm de *mlf*, *mpo* et *Bc* mais n'a pas d'effet sur la quantité d'ARNm *lz* ou de *Renilla luciferase* (*Rl*).

## **Partie II : Etude du mode d'action de MLF et identification de ses partenaires en culture de cellules**

### **II.A. Introduction**

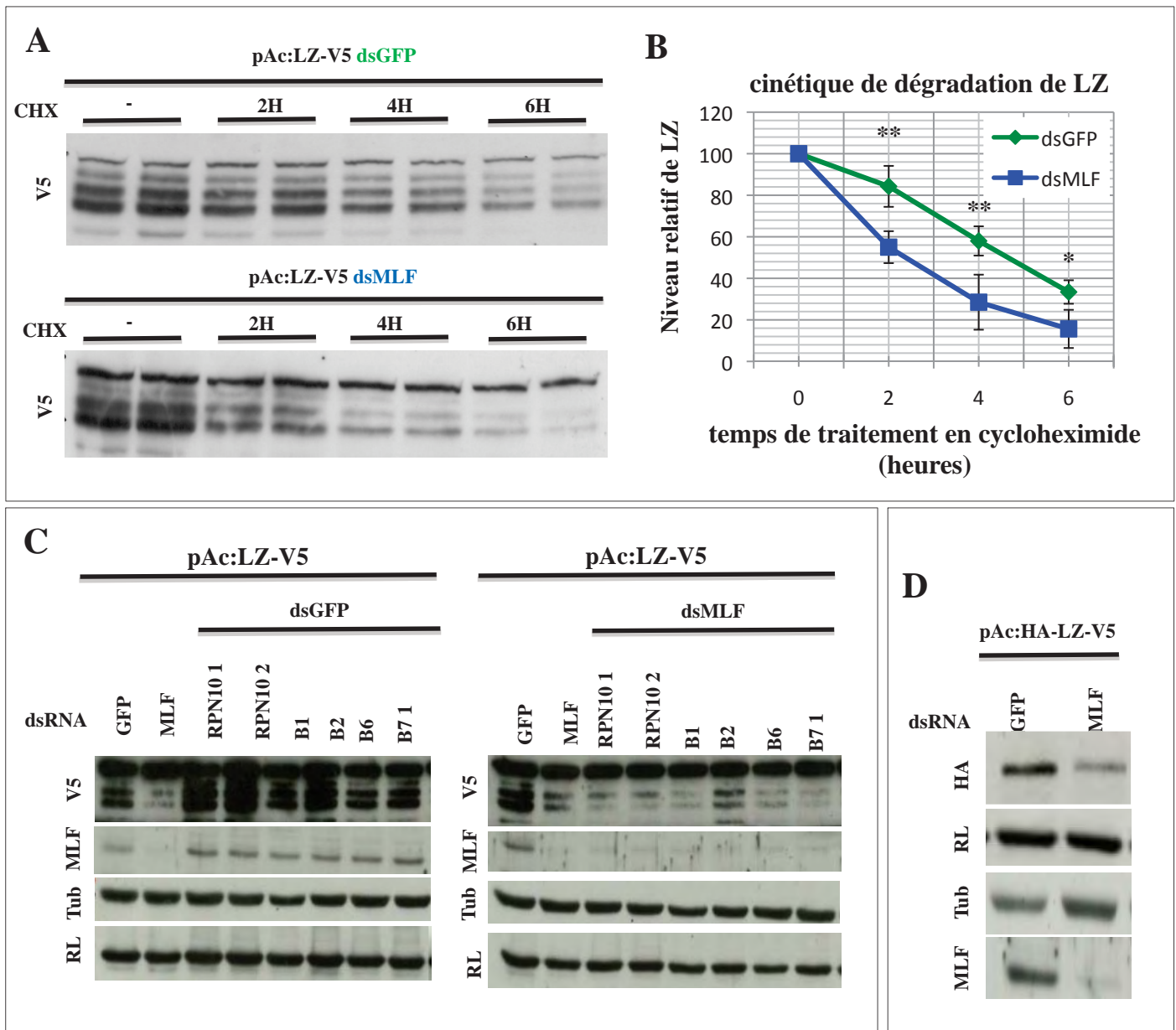
Les résultats précédemment obtenus *in cellulo* et *in vivo* montrent que MLF agit comme un régulateur positif du niveau et de l'activité de LZ (Bras et al., 2012). Dans cette seconde partie, j'ai cherché à mettre en évidence les mécanismes moléculaires par lesquels MLF régule le niveau de LZ. Dans ce but, j'ai travaillé avec des cellules Kc167, une lignée issue de cellules hématopoïétiques embryonnaires de Drosophiles et exprimant le facteur de transcription de type GATA SRP mais pas le facteur de type RUNX LZ. Dans cette lignée, il a précédemment été démontré que, tout comme *in vivo*, MLF régule le niveau de LZ (Bras et al., 2012).

### **II.B. Résultats**

#### **II.B.1. Mode d'action de MLF**

##### **II.B.1.a. MLF régule post-traductionnellement le niveau de LZ**

Dans un premier temps afin de confirmer que MLF régule le niveau d'expression de LZ dans les cellules Kc167, j'ai transfecté un vecteur contenant la région codante d'une version étiquetée de LZ sous contrôle d'un promoteur actine (pAc-LZ-V5) dans ces cellules préalablement traitées par un dsRNA dirigé contre MLF ou contre la GFP. En accord avec les données précédentes (Bras et al., 2012), les analyses en Western-blot montrent que la déplétion de MLF par RNAi diminue non seulement le niveau de MLF mais également de LZ observé ici avec un anticorps dirigé contre le tag C-terminal V5 (**Figure 30 A**). La quantification de plusieurs western-blots montre que cette diminution est de l'ordre de  $\pm 70\%$  (**Figure 30 B**). A l'inverse, la déplétion de MLF n'affecte pas ou peu l'expression de la Renilla Luciferase, elle aussi exprimée sous contrôle du promoteur actine (pAc-RL). De plus, les résultats que j'ai obtenus par qRT PCR montrent que suite à un traitement par un dsRNA



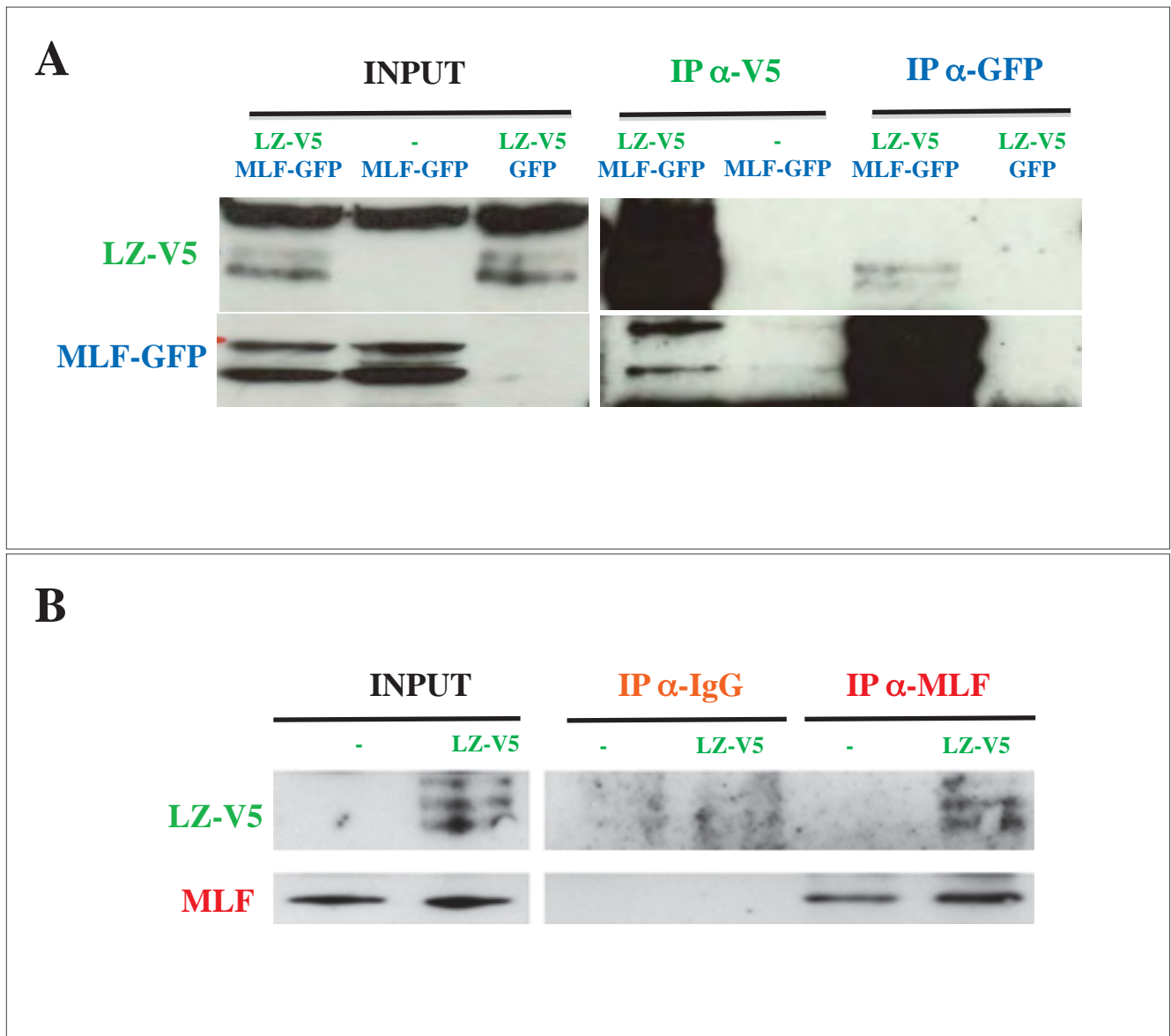
**Figure 31 : MLF régule la stabilité de la protéine LZ en la protégeant de la dégradation par une voie indépendante du protéasome.**

(A) Western-blots montrant le niveau de protéine LZ-V5 dans des cellules Kc167 transfectées avec pAc:LZ-V5, traitées avec un dsRNA ciblant *mlf* ou la GFP et incubées pendant le temps indiqué avec de la cycloheximide (CHX). (B) Quantification du niveau relatif de LZ sur différentes expériences. (C) Effet de dsRNA ciblant différentes sous-unités du protéasome sur l'expression de LZ-V5 en présence (panel de gauche; dsGFP) ou en absence de MLF (panel de droite; dsMLF) dans des cellules Kc167. (D) Effet de la déplétion de MLF par dsRNA dans les cellules Kc167 sur l'expression d'une protéine LZ tagguée en N et en C-terminal (pAc:HA-LZ-V5), visualisée ici par western blot contre le tag HA N-terminal. La tubuline endogène (Tub) et la Renilla Luciferase (RL) sont utilisés en contrôle de charge et de transfection respectivement.

ciblant *mlf* on observe bien une diminution des ARNm *mlf* alors que les ARNm *lz* ne sont pas significativement affectés. La diminution de l'expression de la protéine LZ que l'on observe dans ces conditions s'accompagne cependant bien d'une diminution de l'expression des ARNm de deux de ses gènes cibles directs, *Bc* et *mpo* (**Figure 30 C**). Un autre facteur essentiel à l'induction transcriptionnelle de *Bc* et *mpo* par LZ est son partenaire SRP, qui est constitutivement exprimé dans les cellules Kc167 (Gobert et al., 2010). Nous avons donc testé si, comme celle de LZ, l'expression de SRP est diminuée en absence de MLF. Comme illustré **Figure 30 D**, la déplétion de MLF ne semble pas affecter l'expression de SRP. L'ensemble de ces résultats montre donc que, dans les Kc167, MLF régule le niveau d'expression de LZ ainsi que son activité transcriptionnelle sans affecter la transcription de *lz* ou la stabilité de son transcrit ; MLF agit donc au niveau post-transcriptionnel.

Au moins deux hypothèses sont alors envisageables : soit MLF agit sur l'efficacité de la traduction de l'ARNm *lz* soit MLF agit sur la stabilité de la protéine LZ. Un effet sur la traduction paraît cependant peu probable car cette régulation du niveau de LZ est observée alors que LZ est exprimée à partir du plasmide pAc:LZ-V5 qui ne contient pas les séquences 3' et 5'UTR de *lz*. Je me suis donc concentré sur l'aspect stabilité. Ainsi, dans le but de déterminer si MLF stabilise LZ, j'ai évalué la cinétique de dégradation de cette protéine dans des cellules Kc167 traitées avec un inhibiteur de la traduction, la cycloheximide, et déplétées ou non pour MLF par RNAi. Les western-blots (**Figure 31 A**) ainsi que leur quantification (**Figure 31 B**) montrent que le niveau de LZ diminue plus rapidement en absence de MLF. Ainsi, la demi-vie de LZ passe de 270' en condition normale à 150' en absence de MLF. Ces données indiquent donc que, dans les Kc167, MLF régule la stabilité de la protéine LZ.

Afin de déterminer si MLF stabilise LZ en le protégeant de la dégradation par le protéasome, j'ai utilisé des dsRNA dirigés contre différents composants de ce complexe afin d'inhiber spécifiquement leur expression (**Figure 31 C**). Les analyses en western-blot montrent que la déplétion de plusieurs composants de ce complexe induit une accumulation de la protéine LZ en présence de MLF (**Figure 31 C, panel de gauche**), mais n'est pas suffisante pour restaurer un niveau normal de LZ en absence de MLF (**Figure 31 C, panel de droite**). Ces résultats suggèrent donc qu'en présence de MLF, LZ est en partie dégradée par le protéasome alors qu'en son absence elle semble dégradée par une autre voie. D'autre part, l'utilisation d'une forme de LZ étiquetée en N- et en C-terminal m'a permis d'exclure que la diminution du niveau de LZ « pleine taille » que nous observons puisse être due à un clivage protéolytique générant éventuellement une ou deux entités stables. En effet, la déplétion de MLF entraîne une diminution du niveau d'HA-LZ-V5 observé avec un anticorps dirigé contre



**Figure 32 : MLF interagit physiquement avec LZ.**

Les cellules Kc167 ont été transfectées avec les plasmides permettant l'expression de LZ-V5, MLF-GFP et/ou GFP comme indiqué. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités (IP) avec un anticorps anti-V5 ou anti-GFP (A) ou bien avec des IgG ou un anti-MLF (B). Les western-blots ont été réalisés avec des anticorps anti-V5, anti-GFP ou anti-MLF comme indiqué.

le tag C-terminal V5 mais également avec un anticorps dirigé contre le tag N-terminal HA (**Figure 31 D**) et je n'ai pas observé l'apparition d'un fragment N ou C-terminal tronqué « stable » de LZ dans ces conditions (**non montré**). Il est également à noter que cette diminution est également observée en culture cellulaire avec l'anticorps anti-LZ utilisé au cours des analyses *in vivo* et qui reconnaît un épitope dans la région C-terminale de LZ (**non montré**).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère fortement que MLF régule l'activité de LZ en inhibant sa dégradation par une voie indépendante du protéasome.

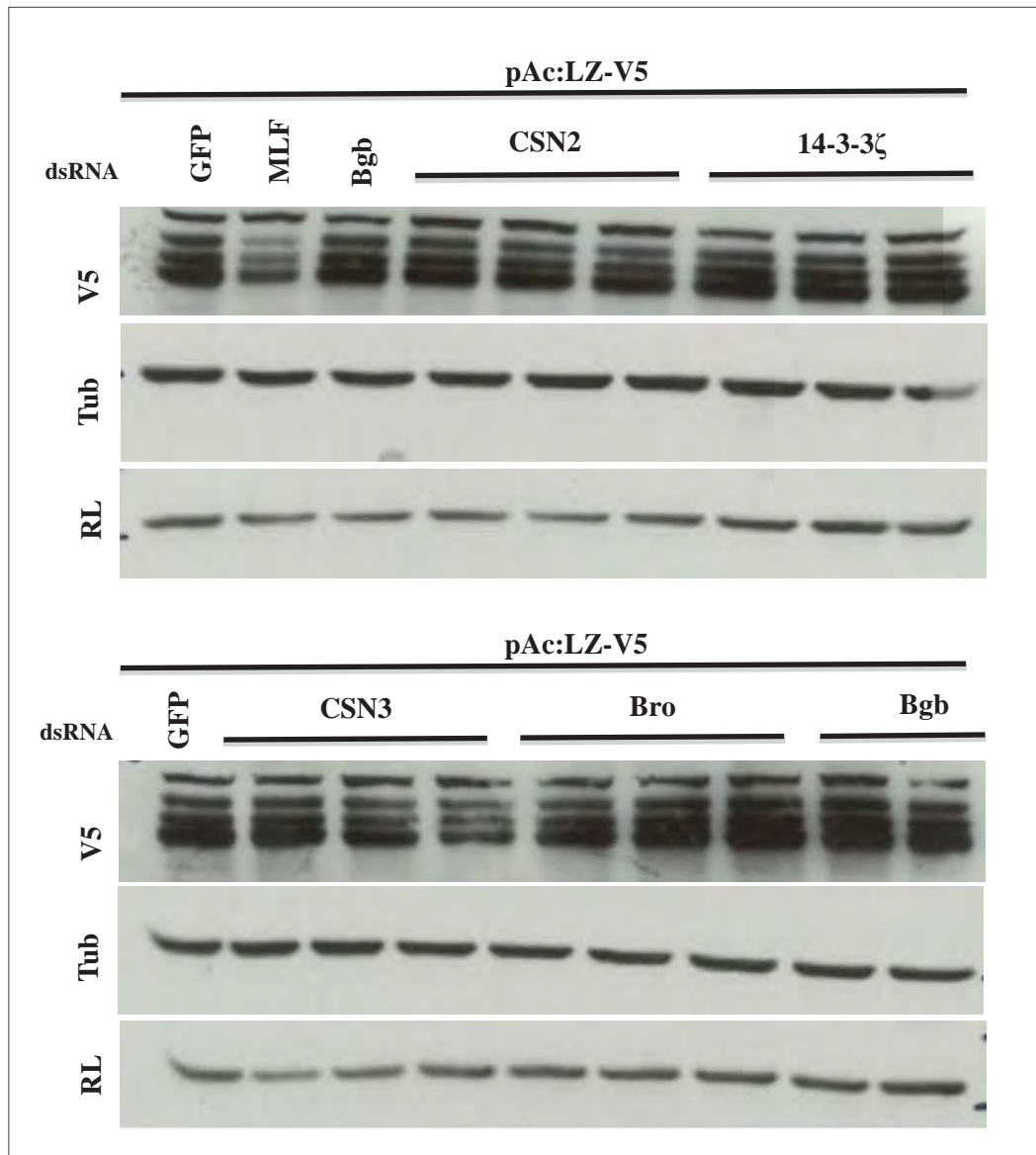
### **II.B.1.b. MLF et LZ interagissent physiquement**

Sachant que, dans les cellules Kc167 et *in vivo*, MLF et LZ co-localisent dans le noyau et que MLF semble réguler post-traductionnellement le niveau de LZ, j'ai cherché à déterminer si ces deux protéines interagissent physiquement. Dans ce but, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules Kc167 transfectées avec des formes taguées V5 et GFP de LZ et MLF, respectivement (**Figure 32 A**). Les résultats obtenus montrent que l'immunoprécipitation de LZ-V5 entraîne la co-immunoprécipitation de MLF-GFP et inversement. De plus, une immunoprécipitation de la protéine MLF endogène nous a aussi permis de co-précipiter la protéine LZ-V5 exprimée ectopiquement dans les cellules Kc167 (**Figure 32 B**). Ces résultats indiquent donc que MLF et LZ sont capables d'interagir physiquement.

Afin de déterminer si l'interaction entre LZ et MLF est nécessaire à la régulation du niveau de LZ par MLF, j'ai construit une série de plasmides permettant l'expression de mutants de délétions de LZ en culture cellulaire afin de tester d'une part si l'expression de ces différentes versions de LZ est sensible à la déplétion de MLF et d'autre part si elles interagissent avec MLF. Inversement, nous avons obtenu ou généré des vecteurs d'expression pour identifier le(s) domaine(s) de MLF impliqué(s) dans la régulation de LZ et l'interaction avec cette dernière. Cependant, nous avons rencontré différents problèmes pour l'expression de ces versions mutantes de LZ et MLF et la réalisation de ces expériences est toujours en cours.

### **II.B.1.c. Mode d'action de MLF : analyse candidat**

Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que MLF interagit avec LZ et régule sa stabilité. Ce modèle laisse penser que certains des partenaires connus de LZ ou de MLF



**Figure 33 : La régulation du niveau de LZ semble indépendante du signalosome COP9, de 14-3-3ζ ainsi que de Brother et Big Brother.**

Western-blot montrant le niveau de LZ-V5 après transfection dans des cellules Kc167 traitées avec des dsRNA contre MLF, la GFP, CSN2, CSN3, Brother (Bro), Big Brother (Bgb) ou 14-3-3ζ comme indiqué. La tubuline endogène (Tub) et la Renillaluciferase (RL) sont utilisés en contrôle de charge et de transfection respectivement. 3 dsRNA différents ont été utilisés pour chaque facteur testé.



pourraient être impliqués dans la mise en place de cette régulation. En effet, d'une part, il a été montré chez les mammifères que l'interaction de RUNX1 avec son partenaire CBF $\beta$  ce qui empêche sa dégradation (Huang et al., 2001). D'autre part, MLF interagit avec la sous-unité 3 du signalosome COP9 (CSN3) chez la Drosophile et chez les mammifères et, chez ces derniers, il a été proposé que l'interaction avec CSN3 stabilise de p53 en inhibant l'ubiquitine ligase COP1 (Yoneda-Kato et al., 2005). De plus, il a été proposé que l'interaction des protéines MLF avec les protéines 14-3-3-zeta régule leur localisation subcellulaire et pourrait donc affecter leur fonction (Lim et al., 2002; Winteringham et al., 2006). J'ai donc cherché à déterminer si chez la Drosophile les homologues de CBF $\beta$ , Brother (Bro) et Big Brother (Bgb), des composants du signalosome COP9 et/ou 14-3-3zeta sont impliqués dans la régulation du niveau de LZ (**Figure 33**). J'ai donc utilisé des dsRNA dirigés contre *bro*, *bgb*, les sous-unités 2 et 3 du signalosome (*csn2*, *csn3*) ainsi que *14-3-3zeta* afin de déterminer l'impact de la déplétion des protéines correspondantes sur le niveau d'expression de LZ dans les cellules Kc167 transfectées avec pAc-LZ-V5. Afin d'éviter des effets off-target, pour chacun des candidats j'ai utilisé trois dsRNA différents et prédits pour ne pas générer de 19-mer ciblant un autre transcrit. Mes résultats montrent que l'inhibition de l'expression de ces facteurs par RNAi n'affecte pas le niveau de protéine LZ, suggérant donc qu'ils ne sont pas impliqués dans la régulation de la stabilité de LZ dans les cellules Kc167.

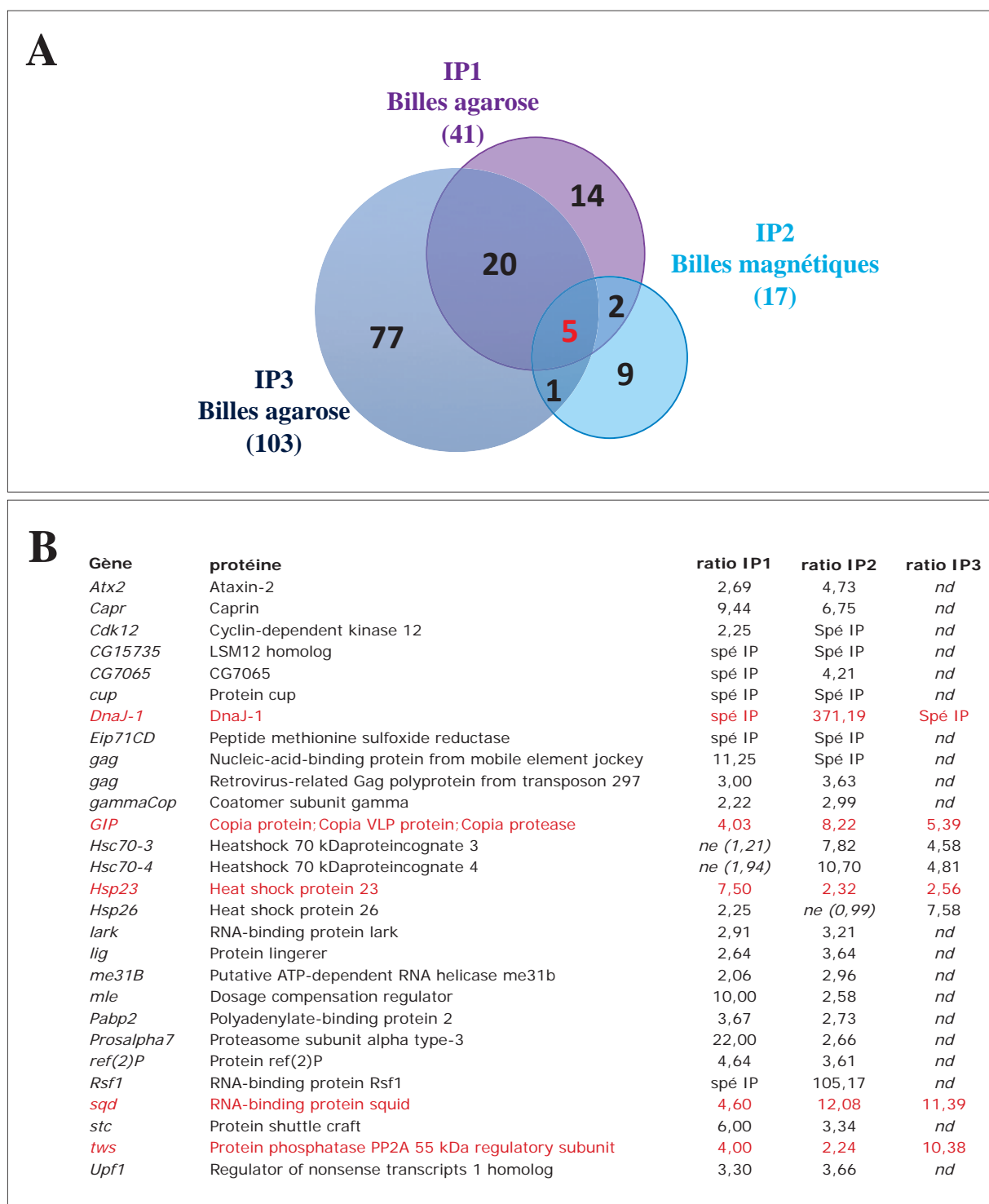
Il est cependant envisageable d'une part qu'il y ait une redondance fonctionnelle entre Bro et Bgb et d'autre part qu'en présence de MLF, LZ ne soit pas régulé par le signalosome mais qu'il le devienne en son absence. Il serait donc intéressant de tester l'effet de la déplétion conjointe de Bro et Bgb ainsi que l'effet de la déplétion de CSN2 ou CSN3 sur le niveau de LZ en absence de MLF.

Ainsi, les résultats que j'ai obtenus par des expériences de RNAi en culture cellulaire contre des partenaires connus de MLF ou de LZ ne m'ont pas permis de mettre en évidence leur implication dans la régulation de l'expression de LZ.

## **II.B.2. DNAJ1 : un partenaire de MLF qui régule le niveau de LZ**

### **II.B.2.a. Identification des partenaires de MLF par spectrométrie de masse**

Afin d'ouvrir de nouvelles pistes quand aux mécanismes moléculaires d'action de MLF, nous avons donc décidé d'identifier de nouveaux partenaires de cette protéine par une approche de spectrométrie de masse (en collaboration avec la plateforme de protéomique de



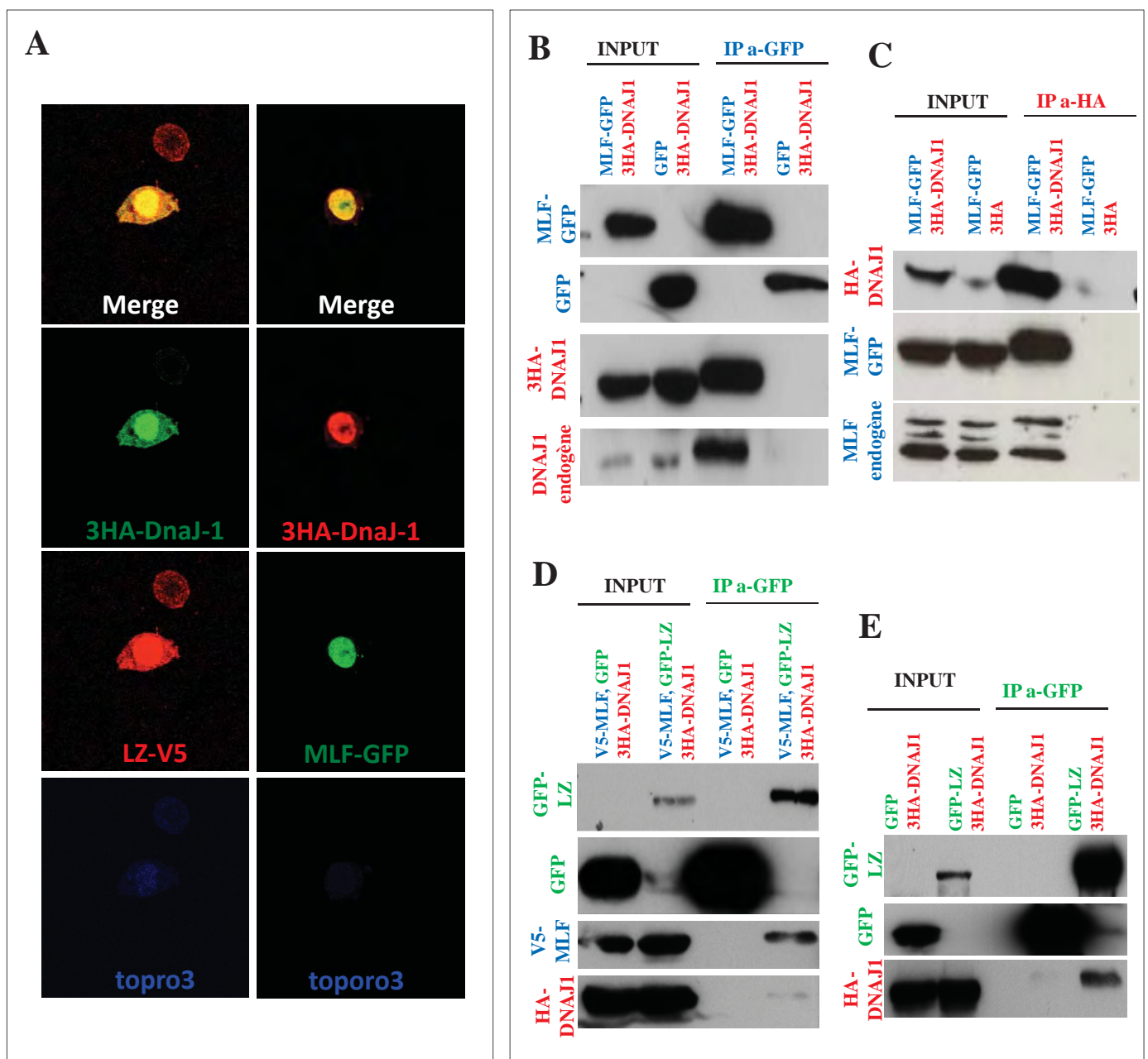
**Figure 34 : Identification de partenaires de MLF.**

(A) Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines retrouvées enrichies dans les extraits de cellules Kc167 exprimant la protéine MLF-V5 par rapport aux cellules Kc167 contrôle après purification sur billes couplées à un anticorps anti-V5 et spectrométrie de masse. (B) Liste des 28 protéines retrouvées associées à MLF-V5 dans au moins deux des 3 expériences d'immunopurification. Le niveau d'enrichissement pour chaque expérience est indiqué. Spé IP= protéine détectée uniquement dans l'échantillon MLF-V5. nd : protéine non détectée. Ne : protéine non enrichie. Les 5 protéines retrouvées dans les 3 conditions sont indiquées en rouge.

l'IPBS/Génotoul). Pour cela, nous avons établi une lignée stable de cellules Kc167 ayant intégré le plasmide pMT:MLF-V5-6His qui permet l'expression inducible au cuivre (promoteur méthalthionine) d'une version étiquetée de MLF : MLF-V5-6HIS. En conditions d'induction, cette lignée permet l'expression de MLF-V5-6HIS à des niveaux équivalents à ceux de la protéine MLF endogène (**non montré**). A partir de cette lignée j'ai donc immunoprécipité MLF-V5-6HIS avec un anticorps dirigé contre V5 couplé soit à des billes agarose soit à des billes magnétiques puis identifié par spectrométrie de masse les protéines co-immunoprécipitées. On notera que lors de la mise au point du protocole, nous avons observé une meilleure immunoprécipitation de MLF-V5 avec l'anti-V5 couplé aux billes d'agarose qu'aux billes magnétiques, ce qui a été confirmé lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Globalement, cette approche a conduit à l'identification d'une centaine de protéines enrichies (>2 fois) ou uniquement présentes dans les échantillons préparés à partir de la lignée de Kc167 pMT:MLF-V5-6His traitée au cuivre par rapport aux échantillons contrôles (préparés à partir de Kc167 « naïves » traitées au cuivre) (**Figure 34 A**). Parmi ces protéines, 28 sont retrouvées dans deux des trois expériences (**Figure 34 B**) et 5 sont retrouvées systématiquement dont le co-chaperon DNAJ1. Cette dernière est la plus abondante (après MLF) dans les 3 échantillons analysés. DNAJ1 avait été précédemment identifiée en tant que partenaire potentiel de MLF lors d'un crible pangénomique en double hybride (Formstecher et al., 2005). De plus, tout comme MLF, DNAJ1 est impliquée dans la suppression de la toxicité induite par les protéines polyglutamiques (Chan et al., 2000; Fayazi et al., 2006; Fernandez-Funez et al., 2000; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2000). Ainsi, de part son rôle dans le maintien de l'homéostasie des protéines ainsi que son lien physique et fonctionnel avec les protéines MLF, je me suis particulièrement intéressée à DNAJ-1 et à son éventuel rôle dans la régulation de LZ.

#### **II.B.2.b. DNAJ1 interagit physiquement avec MLF et LZ**

Suite à l'identification de DNAJ1 en tant que partenaire potentiel de MLF par spectrométrie de masse, j'ai testé si ces deux protéines co-localisent et j'ai cherché à confirmer qu'elles sont capables d'interagir physiquement. L'expression de formes taguées de DNAJ1 (HA), MLF (GFP) ou LZ (V5) dans les cellules Kc167 m'a permis de montrer par immunofluorescence que DNAJ1 est majoritairement nucléaire et co-localise avec MLF et LZ (**Figure 35 A**). De plus, mes résultats montrent que l'immunoprécipitation de GFP-MLF (mais pas de la GFP seule) permet de coprécipiter HA-DNAJ1 ainsi que DNAJ-1 endogène (**Figure**



**Figure 35 : MLF, DNAJ1 et LZ co-localisent dans le noyau et interagissent physiquement les uns avec les autres.**

(A) Localisation subcellulaire de 3HA-DNAJ1, de LZ-V5 et de MLF-GFP en immunofluorescence contre les tags HA, V5 ou GFP dans les Kc167. Le toporo3 permet de visualiser les noyaux. (B-E) Co-immunoprécipitation entre LZ, MLF et DNAJ1 dans les Kc167. Les Kc167 ont été transfectées avec les plasmides indiqués puis les extraits cellulaires ont été immunoprécipités (IP) avec un anticorps dirigé contre la GFP ou contre HA et des western-blots ont été réalisés avec les anticorps dirigés soit contre les tags GFP, HA ou V5 soit contre MLF ou DNAJ1.

**35 B)** et réciproquement, l'immunoprécipitation de HA-DNAJ1 permet de coprécipiter GFP-MLF et MLF endogène (**Figure 35 C**). Ces résultats confirment donc que MLF et DNAJ1 interagissent spécifiquement l'un avec l'autre.

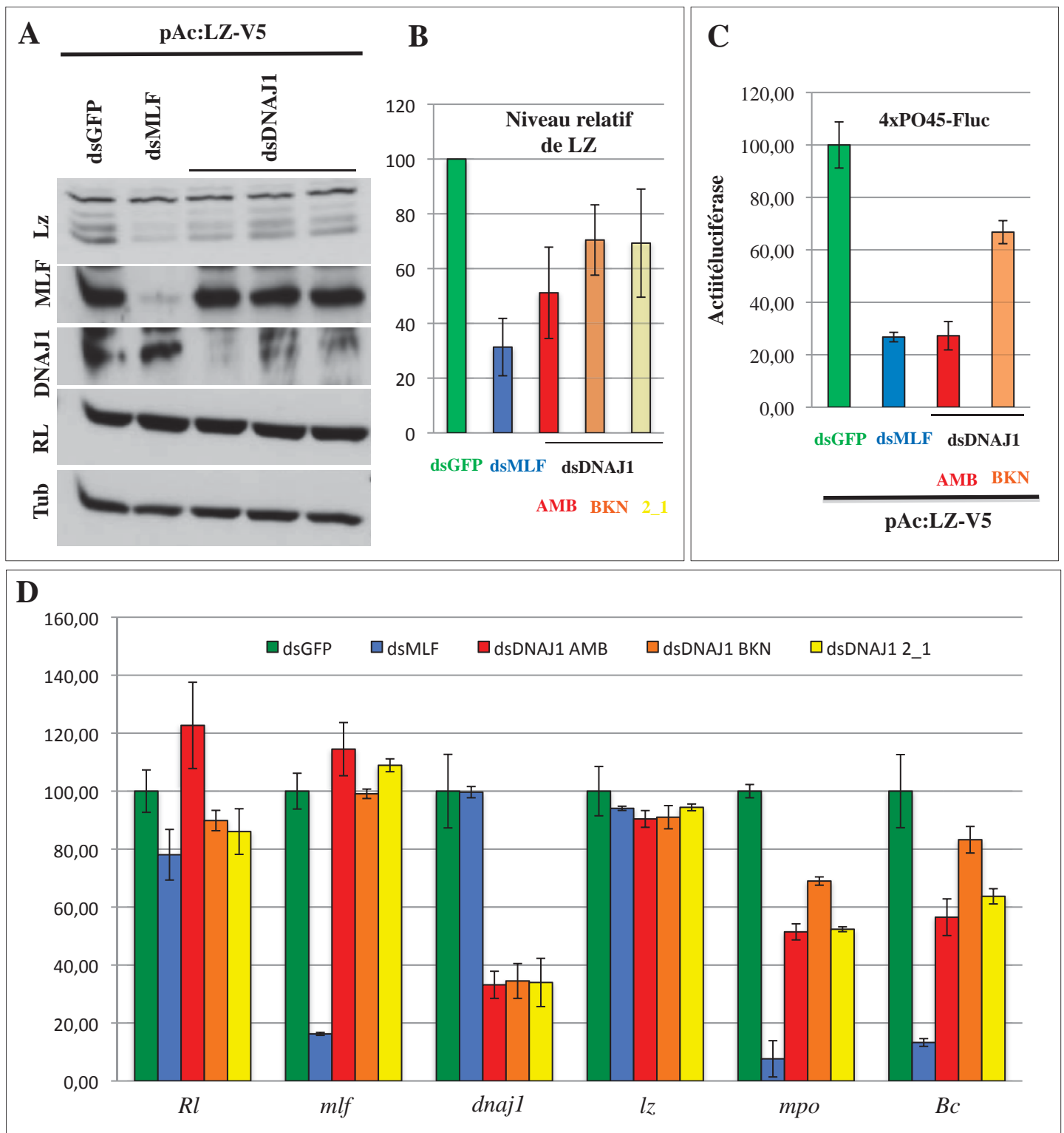
Etant donné que MLF se lie à LZ, j'ai aussi testé si DNAJ1 peut interagir avec ce facteur et en effet, j'ai pu observer que l'immunoprécipitation de GFP-LZ entraîne la co-immunoprécipitation de HA-DNAJ1 (**Figure 35 D et E**). L'ensemble de ces résultats montre donc que dans les cellules Kc167 les protéines MLF, LZ et DNAJ1 sont nucléaires et capables d'interagir physiquement les unes avec les autres. On ne sait cependant pas si ces interactions sont directes ou indirectes.

### **II.B.2.c. DNAJ1 régule post-transcriptionnellement l'activité et le niveau de LZ**

En parallèle j'ai cherché à déterminer si tout comme MLF, DNAJ1 régule le niveau de LZ. Pour cela j'ai transfecté le pAc:LZ-V5 dans des Kc167 préalablement traitées par un dsRNA dirigés contre DNAJ-1 ou par des dsRNA dirigés contre MLF ou contre la GFP. Afin d'éviter l'effet off-target, trois dsRNA dirigés contre différentes parties de DNAJ1 ont été utilisés. Les analyses en western-blot (**Figure 36 A**) ainsi que leur quantification (**Figure 36 B**) montrent que la déplétion de DNAJ1 par chacun des trois différents dsRNA diminue non seulement l'expression de DNAJ1 mais également celle de LZ, qui chute d'environ 50% pour le dsRNA le plus efficace contre DNAJ1. A l'inverse, ces dsRNA n'affectent pas ou peu l'expression de la *Rénilla Luciferase* sous contrôle du promoteur actine ou celle de MLF endogène. Ces résultats montrent donc que DNAJ1 régule le niveau de LZ et suggèrent que cette régulation se fait au niveau post-transcriptionnel et ne passe pas par une diminution de l'expression de MLF.

Nous avons également déterminé l'effet de la déplétion de DNAJ1 sur l'activité transactivatrice de LZ en utilisant le rapporteur 4xPO45-Fluc (*Firefly Luciferase* sous contrôle des séquences régulatrices d'une cible de LZ : *PO45/mpo*) (**Figure 36 C**). Les résultats obtenus montrent que la déplétion de DNAJ1 réduit l'activité luciférase de ce rapporteur suggérant donc qu'*in cellulo* MLF régule positivement l'activité de LZ, comme le fait MLF.

Pour m'assurer que DNAJ1 ne régule pas la transcription du pAc:LZ-V5 ou l'accumulation du transcrit *lz*, j'ai réalisé des expériences de qRT-PCR dans des cellules Kc167 déplétées ou non pour DNAJ1 par dsRNA (**Figure 36 D**). Les résultats obtenus montrent qu'un traitement avec chacun des trois dsRNA ciblant *DnaJ1* entraîne bien une



**Figure 36 : DNAJ-1 régule le niveau et l'activité de LZ en agissant au niveau post-transcriptionnel**

(A) Western-blot montrant que la déplétion par RNAi de MLF ou de DNAJ-1 (3 dsRNA différents) entraîne une diminution du niveau de LZ-V5. La tubuline (Tub) et la Renilla luciférase (RL) sont utilisés en contrôle de charge et de transfection respectivement. (B) Quantification du niveau relatif de LZ (normalisé par RL) sur différents western-blots. (C) La déplétion par RNAi de MLF ou de DNAJ-1 (2 dsRNA différents) entraîne une diminution de la transactivation du rapporteur 4xPO45-Fluc. (D) qRT-PCR montrant que la déplétion par RNAi de MLF ou de DNAJ-1 (3 dsRNA différents) diminue la quantité d'ARNm *mlf* ou *dnaj-1* respectivement, ainsi que celle de *mpo* et *Bc* mais n'a pas d'effet sur la quantité d'ARNm *lz*.



diminution des ARNm de *DnaJ1* mais sans affecter significativement celle des ARNm de *lz* ou de *mlf*. Par contre, on observe bien une diminution des ARNm de deux cibles de LZ, *Bc* et *mpo*, dans ces conditions. Ces résultats montrent que DNAJ1 régule le niveau d'expression et l'activité de LZ sans affecter ni la transcription de *lz* ni la stabilité de son transcrit. Tout comme son partenaire MLF, DNAJ-1 régule donc post-transcriptionnellement le niveau de LZ dans les cellules Kc167.

Ainsi, mes données suggèrent fortement que MLF, DNAJ1 et LZ forment un complexe protéique impliqué dans la régulation de la stabilité et de l'activité du facteur de transcription LZ.

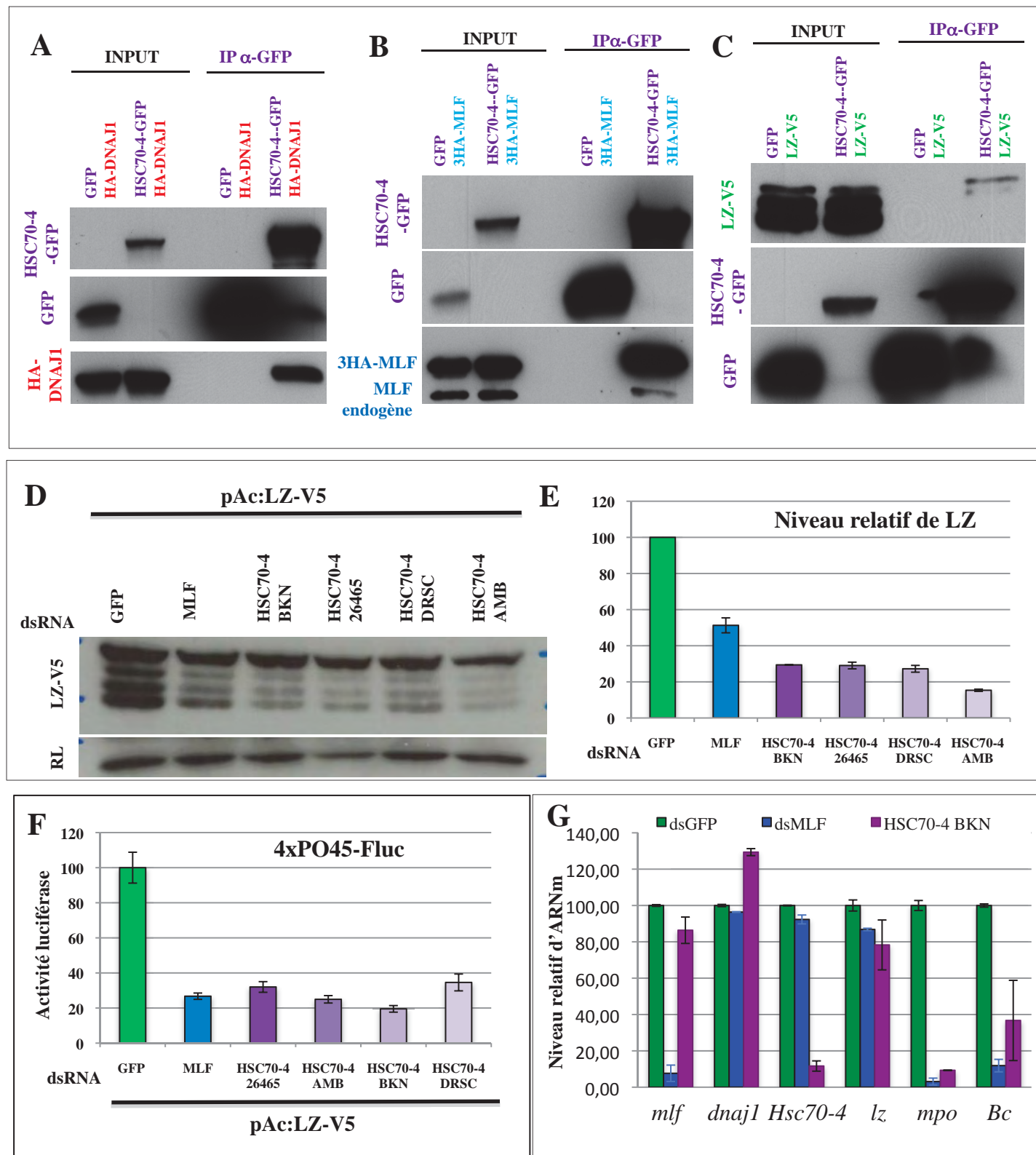
### **II.B.3. Le chaperon HSC70-4 interagit avec LZ et régule son niveau d'expression**

DNAJ1 est une protéine chaperon de la famille HSP40/DNAJ. Elle possède en N-terminal un domaine de type J ainsi qu'un domaine C-terminal conservé et fait partie des protéines DNAJ de type II/DNAJB. Ces protéines possèdent une fonction intrinsèque de chaperon mais sont surtout connues en tant que co-chaperon des protéines HSP70. J'ai donc cherché à déterminer si le niveau de LZ est aussi régulé par des chaperons de la famille HSP70. Chez la Drosophile, cette famille est composée de nombreux membres, néanmoins, l'un d'entre eux, HSC70-4 nous est apparu comme particulièrement intéressant car 1) il fait parti des régulateurs positifs potentiel du complexe SRP/LZ identifié lors du crible RNAi visant à identifier des modulateurs du complexe GATA/RUNX (Gobert et al., 2010), 2) il est fortement exprimé dans le lignage des cellules à cristaux d'après nos données de RNAseq et 3) c'est un partenaire potentiel de MLF d'après nos résultats de spectrométrie de masse. Ainsi, au vu de ces données, j'ai analysé le rôle de cette protéine chaperon dans la régulation du niveau de LZ *in cellulo*.

#### **II.B.3.a. HSC70-4 interagit avec DNAJ-1, MLF et LZ**

Afin de déterminer si HSC70-4 interagit physiquement avec DNAJ1, MLF et LZ, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées en culture cellulaire. Nos résultats montrent que l'immunoprécipitation de HSC70-4-GFP à l'aide d'un anti-GFP entraîne la co-précipitation de HA-DNAJ1 (**Figure 37 A**), de MLF (endogène et HA-MLF) (**Figure 37 B**) ainsi que de LZ-V5 (**Figure 37 C**) indiquant donc qu'*in cellulo* HSC70-4 interagit physiquement avec ces trois protéines.





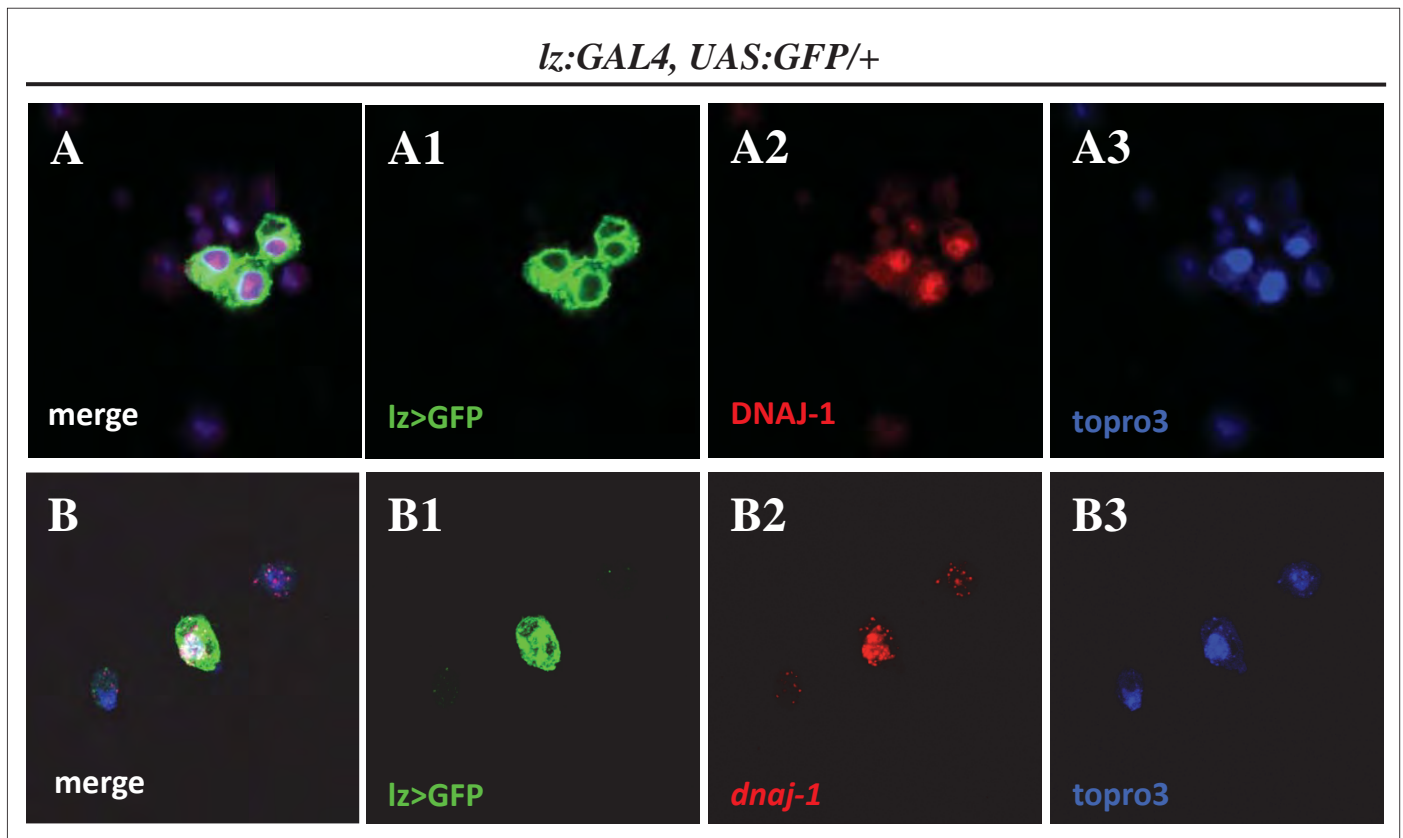
**Figure 37 : HSC70-4 interagit physiquement avec DNAJ-1, MLF et LZ et régule post-transcriptionnellement le niveau et l'activité de LZ.**

(A-C) Interactions entre HSC70-4, DNAJ-1, MLF et LZ dans les cellules Kc167. Les cellules ont été transfectées avec les vecteurs d'expression pour les protéines indiquées puis les extraits cellulaires ont été immunoprécipités (IP) avec un anticorps dirigé contre la GFP et des western-blots ont été réalisés avec les anticorps dirigés soit contre les tags GFP, HA ou V5 soit contre MLF. (D) Western-blot montrant que la déplétion par RNAi de MLF ou de HSC70-4 (4 dsRNA différents) entraîne une diminution du niveau de LZ-V5. La Renilla luciférase (RL) est utilisée comme contrôle interne. (E) Quantifications du niveau relatif de LZ (normalisé par le niveau de RL) sur différents western-blots. (F) La déplétion par RNAi de MLF ou de HSC70-4 (4 dsRNA différents) entraîne une diminution de la transactivation du rapporteur 4xPO45-Fluc par LZ. (G) qRT PCR montrant que la déplétion par RNAi de HSC70-4 diminue les ARNm de *HSC70-4*, de *mpo* et *Bc*, mais n'a pas d'effet significatif sur la quantité d'ARNm *lz*.

### II.B.3.b. HSC70-4 régule post-transcriptionnellement le niveau d'expression de LZ

En parallèle, afin de déterminer si, comme MLF et DNAJ1, HSC70-4 régule le niveau de LZ, j'ai transfecté le pAc:LZ-V5 dans des cellules Kc167 préalablement traitées avec différents dsRNA dirigés contre HSC70-4 (4 dsRNA différents) ou contre la GFP. Les analyses en western-blot (**Figure 37 D**) ainsi que leur quantification (**Figure 37 E**) montrent que l'inhibition de l'expression de HSC70-4 par les différents dsRNA diminue également de  $\pm 70$  % le niveau de protéine LZ. A l'inverse, ces dsRNA ne semblent pas ou peu affecter l'expression de la *Rénilla Luciferase* sous contrôle du promoteur actine. De plus, l'inhibition de l'expression de HSC70-4 entraîne une diminution de la transactivation par LZ du gène rapporteur 4xPO45-Fluc (**Figure 37 F**). Les résultats de qRT-PCR montrent que la déplétion de HSC70-4 par dsRNA entraîne une diminution des ARNm *HSC70-4* mais sans affecter significativement le niveau d'ARNm *lz* ni celui de *mlf* ou de *DnaJ1* (**Figure 37 G**). A l'inverse, en accord avec nos tests de transactivation sur le rapporteur 4xPO45-Fluc, une diminution de l'expression de deux gènes cibles de LZ *Bc* et *mpo* est observée. Ces résultats indiquent donc que HSC70-4 régule post-transcriptionnellement le niveau et l'activité de LZ.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans les cellules Kc167 conduit à proposer que MLF forme un complexe avec le facteur de transcription LZ, le chaperon HSC70-4 et son co-chaperon DNAJ1 permettant la stabilisation de LZ et donc la régulation de son activité.



**Figure 38 : DNAJ-1 est exprimée dans le lignage LZ+ circulant chez les larves au troisième stade de développement.**

(A) Immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre DNAJ-1 (en rouge) sur des saignées de larves L3 portant le transgène *lz:GAL4, UAS:GFP/+* (en vert). (B) Hybridation *in situ* contre l'ARNm de *dnaj-1* (en rouge) et immunofluorescence contre la GFP (en vert) sur des saignées de larves L3 portant le transgène *lz:GAL4, UAS:GFP/+*. Le topopro3 (bleu) est utilisé pour marquer le noyau des cellules.

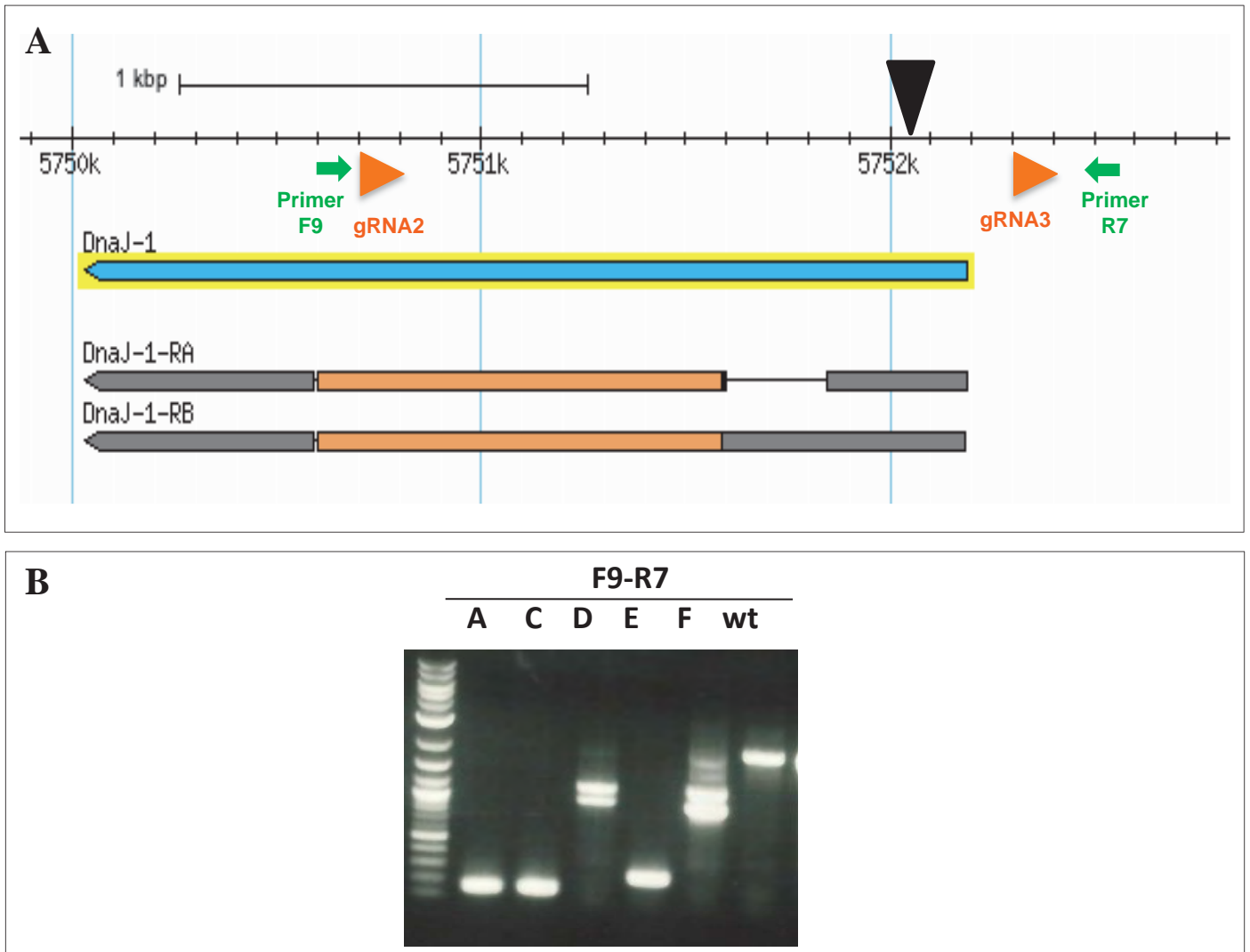
## **Partie III : Caractérisation du rôle de DNAJ1 au cours du développement des cellules à cristaux circulantes chez la larve**

### **III.A. Introduction**

Les résultats obtenus *in vivo* chez la larve L3 montrent que MLF régule le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes larvaires en agissant sur le niveau de LZ. Les résultats obtenus *in cellulo* indiquent quant à eux que le chaperon DNAJ1 est un partenaire physique de MLF également impliqué dans la régulation du niveau et de l'activité de LZ. Ainsi, dans cette troisième partie, nous nous sommes intéressés au rôle de DNAJ1 au cours de l'hématopoïèse et en particulier dans le développement des cellules à cristaux.

### **III.B. Résultats**

L'analyse par immunofluorescence du profil d'expression de DNAJ1 montre que ce chaperon est fortement exprimé dans le lignage LZ+ où il semble s'accumuler dans le noyau par comparaison aux cellules LZ- (**Figure 38 A**). Des expériences d'hybridation *in situ* nous ont permis de confirmer que *DnaJ1* est exprimé dans le lignage LZ+, potentiellement à un niveau plus élevé que dans les autres cellules sanguines circulantes (**Figure 38 B**). Ces résultats suggèrent donc que *DnaJ1* pourrait jouer un rôle dans le contrôle du développement des cellules à cristaux larvaires. Cependant, aucun allèle mutant pour *DnaJ1* n'avait été caractérisé et sa fonction n'avait été étudiée que par des approches de surexpression dans le cadre de modèles de maladies neurodégénératives (Chan et al., 2000; Fayazi et al., 2006; Fernandez-Funez et al., 2000; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2000). En particulier, différentes lignées présentant un élément transposable inséré à proximité de *DnaJ1* sont disponibles dans les collections de Drosophiles, mais aucun de ces transposons n'est inséré dans la séquence transcrite de *DnaJ1*. De plus, la plus petite déficience couvrant *DnaJ1* (*Def(3L)BSC884*) disponible dans les collections de Drosophile affecte 6 autres gènes et est homozygote létale au stade embryonnaire. Enfin, une approche avec des lignées UAS-dsRNA permettant potentiellement d'inhiber l'expression de *DnaJ1* ne m'a pas permis de mettre en évidence de phénotype hématopoïétique dans les cellules LZ+ circulantes en exprimant ces RNAi spécifiquement dans le lignage LZ+ (**non montré**). Il est cependant possible que l'extinction



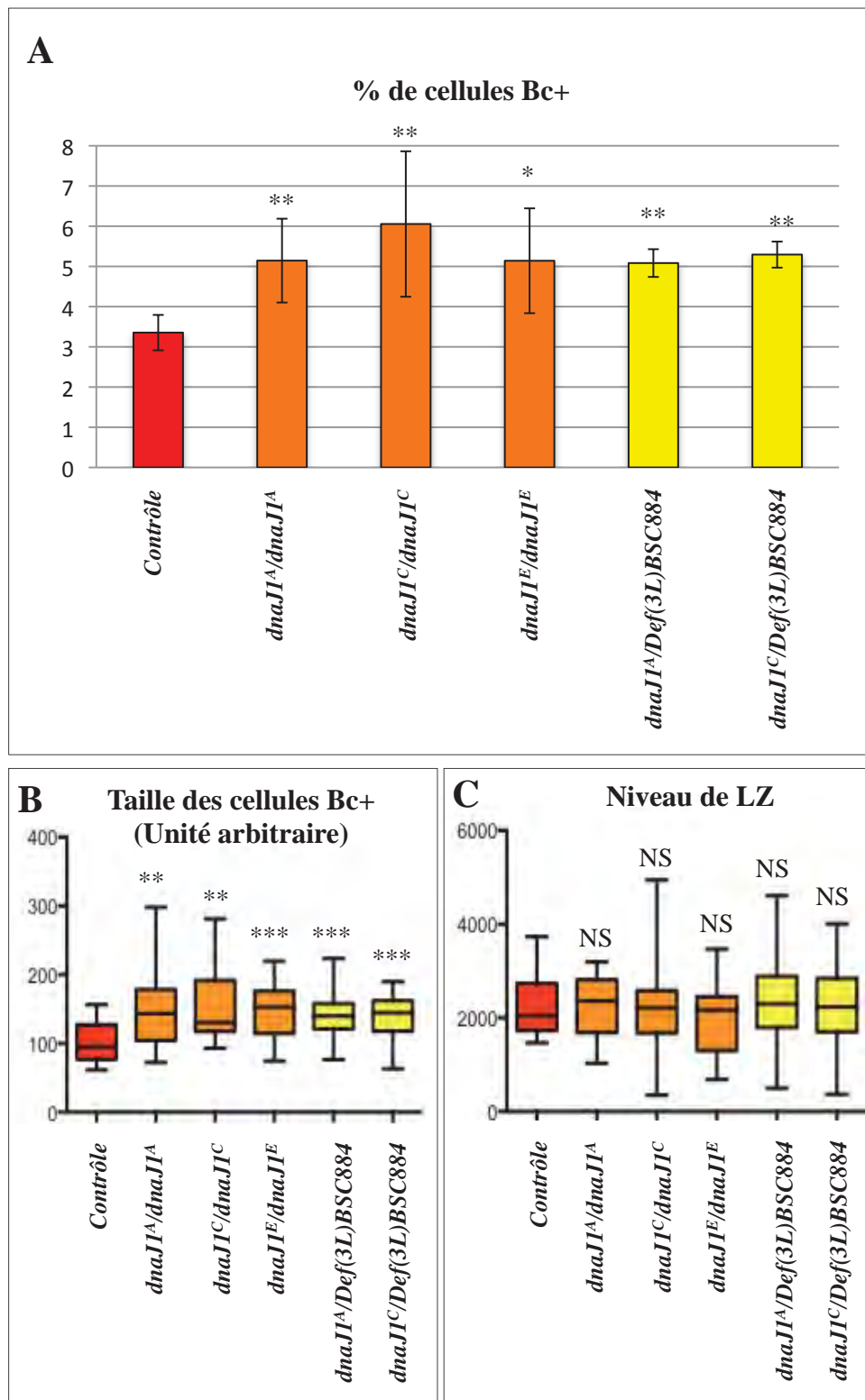
**Figure 39 : Génération d'une lignée de Drosophiles mutantes pour *dnaj1* par CRISPR.**

(A) représentation schématique de *dnaj1*, des ARNs guides (en orange), et de l'élément transposable (triangle noir). (B) PCR réalisées avec les primers F9 et R7 (représentés en vert en A) à partir d'ADN extrait de Drosophiles potentiellement homozygotes mutantes pour *dnaj1* (échelle 2Log).

de *DnaJ1* par ces RNAi ne soit pas suffisamment efficace pour révéler sa fonction. Afin d'analyser les conséquences d'une perte de fonction totale de *DnaJ1*, nous avons donc entrepris de générer une lignée de Drosophiles mutantes pour *DnaJ1*.

### **III.B.1. Etablissement d'une lignée de Drosophiles mutantes pour *DnaJ1***

Afin de générer une lignée de Drosophile mutante pour *DnaJ1* nous avons choisi d'utiliser la technique CRISPR/CAS9 (Xu et al., 2015). Cette technique, dérivée d'un système de défense des bactéries contre les virus, repose sur l'utilisation d'ARNs qui sont dits « guides ». Ces ARNs guides présentent en 5' une séquence permettant de recruter l'endonuclease Cas9 et en 3' un motif de type PAM (proto-spacer adjacent motif, requis pour le clivage de l'ADN par Cas9) suivi d'une séquence complémentaire à la région d'ADN cible qui permet la formation de structures double brin reconnues et clivées par Cas9. Ainsi, l'utilisation de deux ARNs guides permet de générer deux cassures doubles brins et donc une délétion de la région comprise entre les deux séquences ciblées par ces ARNs guides. A l'aide d'outils bioinformatiques (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/> et <http://www.flyrnai.org/crispr2/>), nous avons sélectionné deux guides présentant une séquence PAM (de type NGG) susceptibles de cibler spécifiquement *DnaJ1* et de permettre une délétion quasi complète de ce gène quand on les combine. Nous avons généré des plasmides permettant l'expression de ces deux ARNs guides, l'un ciblant une séquence située dans les régions régulatrices de *DnaJ1* et noté gRNA3 et l'autre situé dans la partie 3' de la séquence codante de *DnaJ1* et noté gRNA2 (**Figure 39 A**). La région située entre ces deux séquences fait environ 1700 pb et contient la majeure partie de la région codante de *DnaJ1*. Ces plasmides ont été co-injectés avec un vecteur d'expression pour la protéine Cas9 dans des embryons de Drosophiles au stade blastoderme syncytial. Pour la sélection des Drosophiles mutantes, nous avons tiré avantage d'une lignée de Drosophiles portant un élément P (P{EPgy2}DnaJ-1<sup>EY04359</sup>) contenant le mini-gène *w* (responsable de la couleur rouge des yeux) inséré juste en amont de la séquence codant pour *DnaJ1* et en aval de la séquence ciblée par le gRNA3. Ainsi, si les 2 gRNA permettent la délétion de la région située entre ces séquences dans la lignée germinale des embryons F0, l'élément P est éliminé et les Drosophiles de la génération F1 auront les yeux blancs. Il est à noter que les Drosophiles portant cet élément P à l'état homozygote sont viables jusqu'au stade adulte et ne présentent pas de modification du nombre ou de la taille des cellules à cristaux circulantes (**non montré**).



**Figure 40 : DNAJ1 contrôle le nombre et la taille des cellules à cristaux circulantes larvaires.**

Les larves des génotypes indiqués ont été saignées au troisième stade de développement et les cellules à cristaux ont été marquées par immunofluorescence contre Bc afin de quantifier (A) leur proportion par rapport aux hémocytes totaux (DAPI+), (B) leur taille et (C) le niveau de LZ visualisé en immunofluorescence.



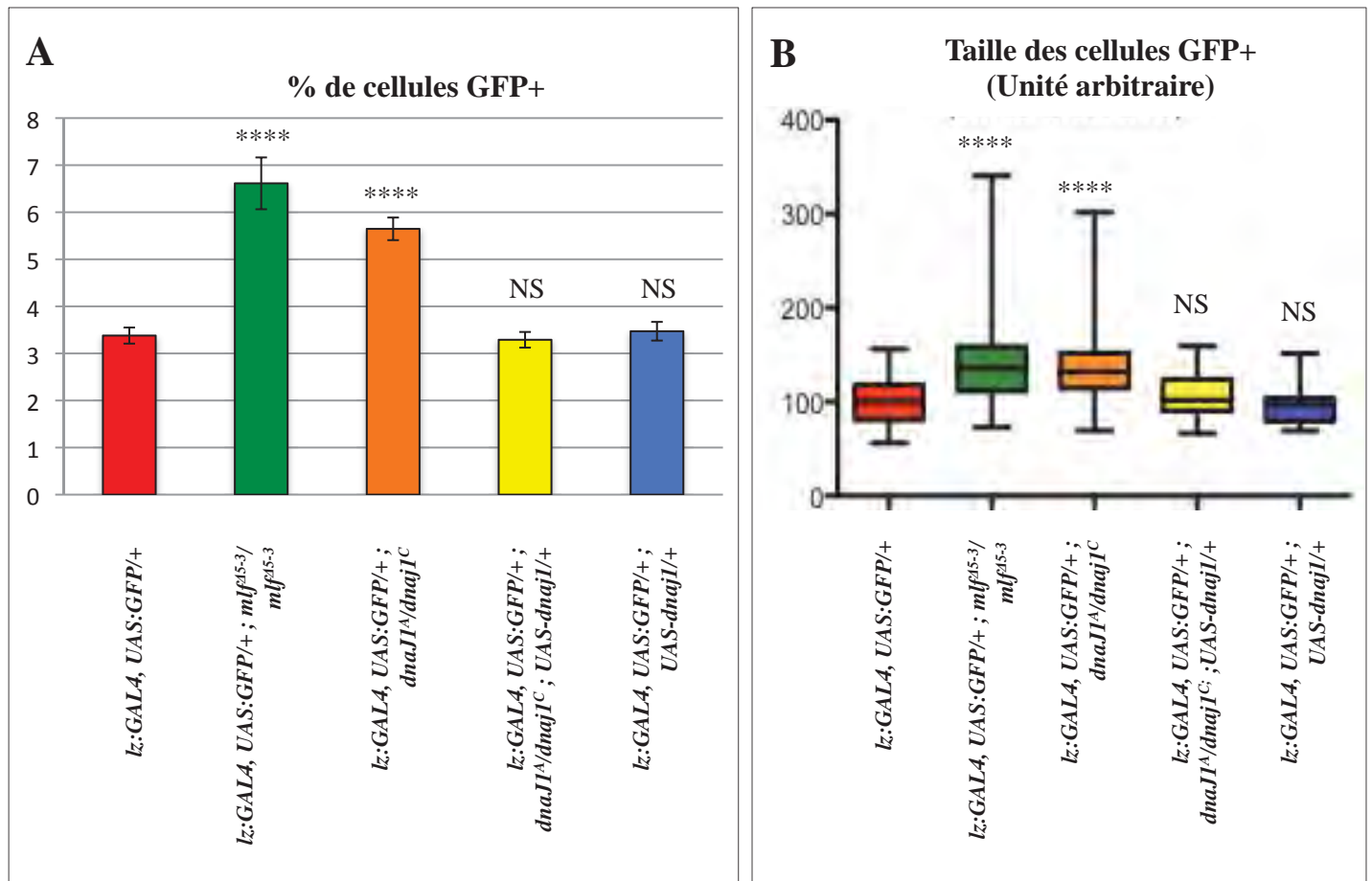
L'utilisation de cette technique a permis de générer cinq lignées indépendantes possédant les yeux blancs et ayant donc potentiellement perdu la région d'ADN contenue entre les séquences ciblées par les deux ARN guides. Afin de caractériser moléculairement ces délétions j'ai extrait l'ADN de ces mouches et réalisé des PCR en utilisant le couple de primers F9/R7. Parmi les cinq lignées générées trois (notées A, C et E) présentent le profil attendu pour une délétion d'environ 1700 pb dans *DnaJ1* (**Figure 39 B**). Les deux autres pourraient correspondre à des remaniements plus complexes. Nous avons séquencé les produits de PCR obtenus pour les lignées A, C et E afin de valider la délétion de la région ciblée de *DnaJ1* et déterminer précisément les points de cassure. Les résultats du séquençage montrent que pour deux des lignées (lignées A et C) la séquence délétée comprend la totalité de la région comprise entre les deux ARNs guides, les points de cassure sont situés dans gRNA2 et gRNA3. Il semble qu'il y ait eu, dans la troisième lignée (lignée E), un événement de réparation d'une centaine de bases. D'autres PCR sur l'ADN génomique de mouches homozygotes des lignées A, C et E m'a permis de montrer que l'organisation du locus de part et d'autre de *DnaJ1* n'est pas affectée (**non montré**).

Cette approche a donc permis de générer trois lignées indépendantes mutantes pour *DnaJ1*: *DnaJ1<sup>A</sup>*, *DnaJ1<sup>C</sup>* et *DnaJ1<sup>E</sup>*. Etant donné la nature moléculaire de la délétion générée, il s'agit très probablement de lignées mutantes nulles pour *DnaJ1*. Elles sont toutes trois homozygotes sub-viables : seule une partie des adultes homozygotes émergent ; ils ne présentent pas de défauts morphologiques apparents mais les males sont stériles. On notera que les larves *DnaJ1<sup>A</sup>/Def(3L)BSC884* sont également viables jusqu'au stade adulte et ne présentent pas non plus de défauts majeurs.

### **III.B.2. Rôle de DNAJ1 au cours de l'hématopoïèse larvaire**

#### **III.B.2.a. DNAJ1 contrôle le nombre et la taille des cellules à cristaux circulantes**

Dans un premier temps j'ai observé les cellules sanguines circulantes de larves L3 dans les trois lignées mutantes pour *DnaJ1* (*DnaJ1<sup>A</sup>*, *DnaJ1<sup>C</sup>* et *DnaJ1<sup>E</sup>*) soit à l'état homozygote (**Figure 40, orange**) soit en hémizygote sur la déficience *Def(3L)BSC884* (**Figure 40 jaune**). Dans chacun de ces contextes génétiques, les cellules à cristaux circulantes, mises en évidence ici par immunofluorescence contre Bc, sont plus nombreuses (**Figure 39 A**) et plus grandes (**Figure 39 B**). De manière surprenante, le niveau de LZ n'est



**Figure 41 : DNAJ1 est requis de manière cellulaire autonome pour contrôler le nombre et la taille des cellules à cristaux circulantes larvaires**

Les larves *lz>GFP* des génotypes indiqués ont été saignées au troisième stade de développement afin de quantifier la proportion de cellules *lz>GFP* par rapport aux hémocytes totaux (DAPI+) (A) ainsi que la taille des cellules *lz>GFP* (B).

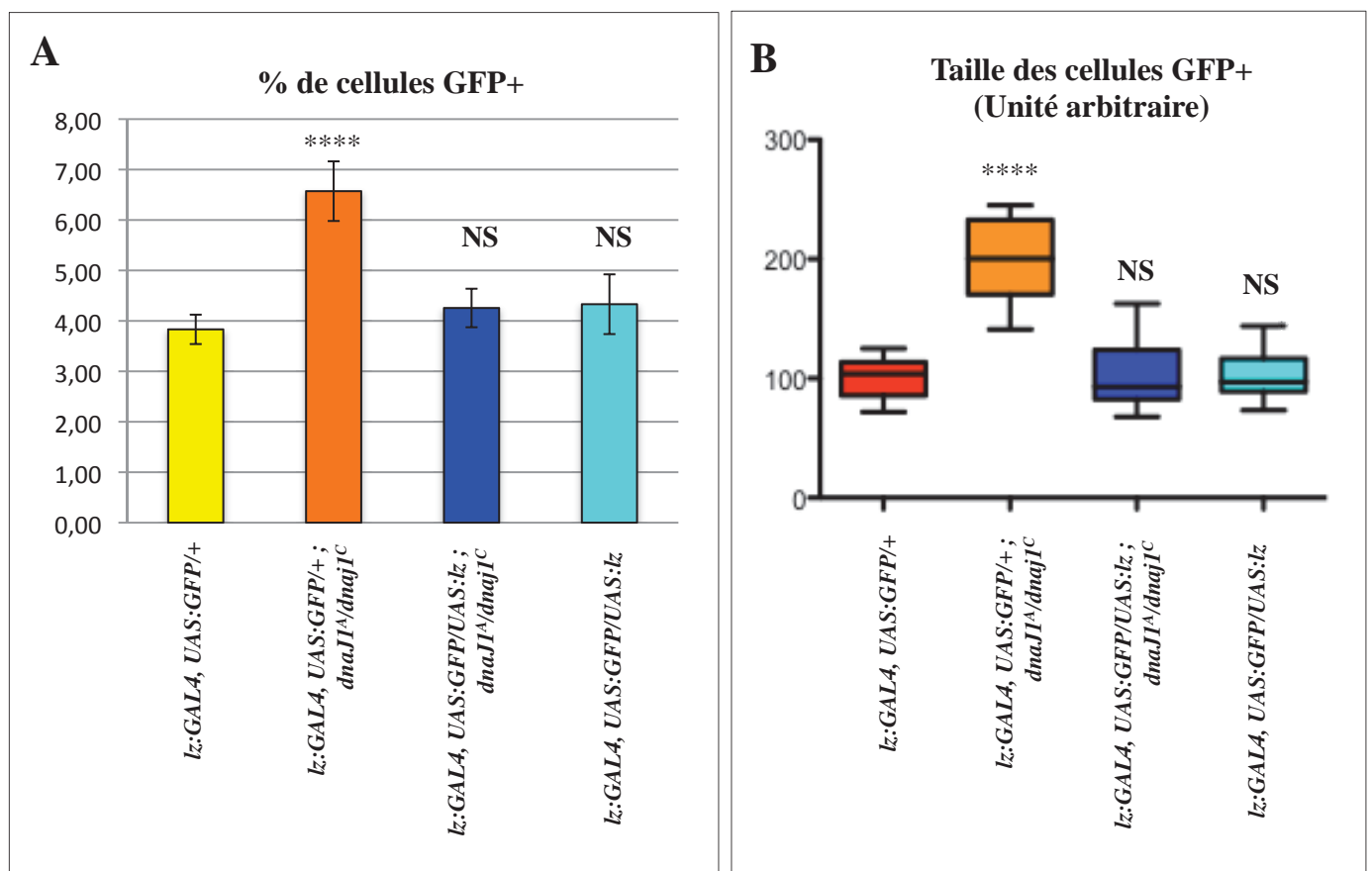
quant à lui pas diminué dans ces différents contextes génétiques (**Figure 39 C**). Des résultats similaires ont été obtenus en visualisant les cellules à cristaux avec les transgènes *lz-GAL4,UAS-GFP* (**Figure 41 et non montrés**).

Dans un second temps, afin de confirmer que ces phénotypes sont bien associés à la perte de *DnaJ1* j'ai tenté de sauver ces phénotypes en ré-exprimant *DnaJ1* spécifiquement dans le lignage LZ+ des larves mutantes pour *DnaJ1* grâce à une lignée *UAS-DnaJ1* et au pilote *lz-GAL4* (**Figure 41, jaune**). Mes résultats montrent que cette ré-expression est capable de sauver les phénotypes d'augmentation du nombre (**Figure 41 A**) et de la taille (**Figure 41 B**) des cellules à cristaux circulantes présents chez les larves mutantes pour *DnaJ1*. Ces résultats démontrent que *DnaJ1* est spécifiquement requis dans le lignage LZ+ pour contrôler le nombre et la taille des cellules à cristaux. Il est à noter ici d'une part, que la surexpression de *DNAJ1* n'a pas d'effet sur le nombre ou la taille des cellules à cristaux (**Figure 41, bleu**) et d'autre part que l'amplitude des phénotypes apparaît plus faible lorsqu'elle est associée à la perte de *DnaJ1* (**Figure 41, orange**) que lorsqu'elle est associée qu'à la perte de *mlf* (**Figure 41, vert**).

Bien que je n'ai pas pu mettre en évidence de diminution du niveau de protéine LZ par immunofluorescence dans les cellules à cristaux des larves mutantes pour *DnaJ1*, les résultats que nous avons obtenus en culture cellulaire et avec l'analyse des larves mutantes pour *mlf* ou hypomorphes pour *lz* m'ont amené à proposer que les phénotypes associés à la perte de *DnaJ1* pourraient être liés à une diminution de « l'activité » de *lz*. J'ai donc testé l'effet de la surexpression de LZ dans les cellules LZ+ de larves mutantes pour *DnaJ1*. Les résultats que j'ai obtenus indiquent que les phénotypes d'augmentation du nombre (**Figure 42 A**) et de la taille (**Figure 42 B**) des cellules à cristaux circulantes sont sauvés quand on surexprime LZ dans le lignage LZ+. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de l'activité de LZ pourrait être à l'origine des phénotypes associés à la perte de *DnaJ1* dans les cellules à cristaux.

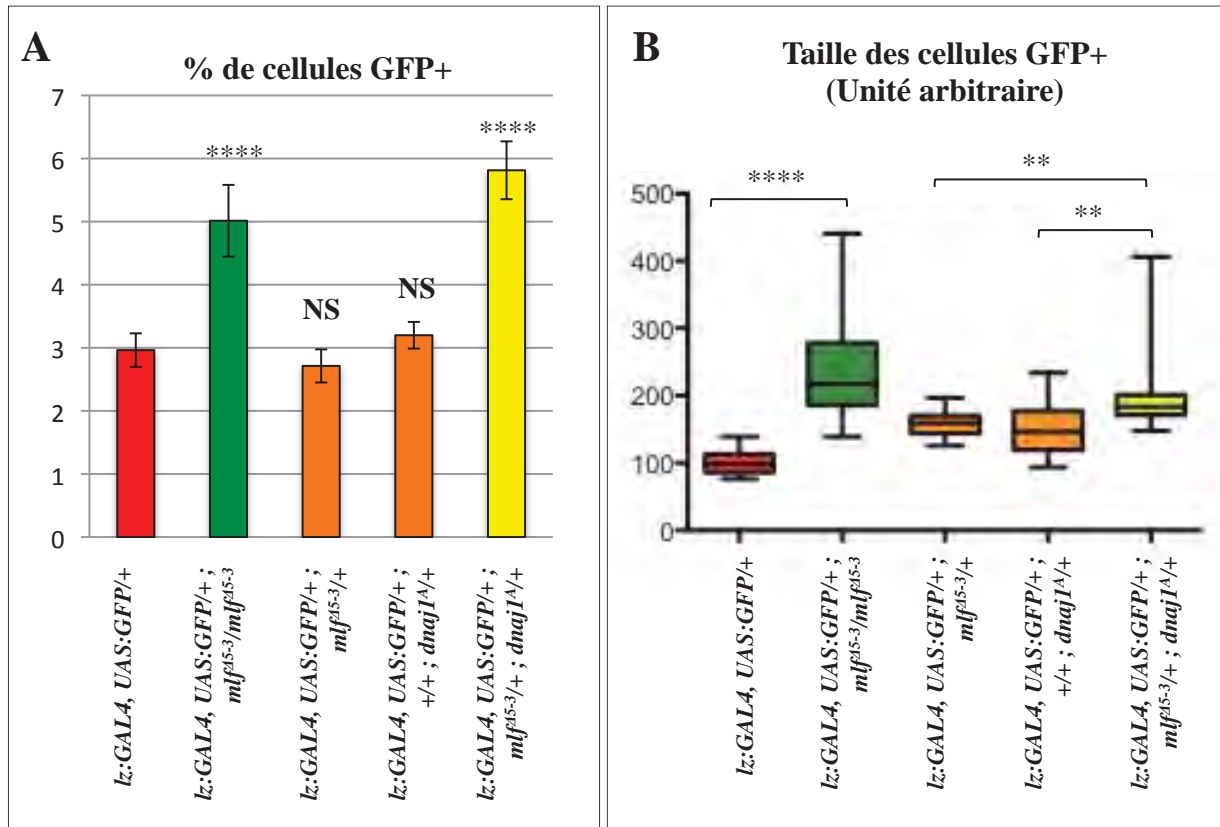
### **III.B.2.b. *DnaJ1* interagit génétiquement avec *mlf* au cours du développement des cellules à cristaux circulantes**

Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que tout comme MLF, *DNAJ1* régule le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes. J'ai donc testé si ces deux facteurs interagissent génétiquement au cours du développement de ces cellules. Alors que le nombre des cellules à cristaux (*lz>GFP+*) n'est pas affecté par la perte d'une dose de *mlf* (*mlf*<sup>45-3/+</sup>) ou de *DnaJ1* (*DnaJ1*<sup>A/+</sup>), en contexte double hétérozygote *mlf*<sup>45-3/+</sup> ;



**Figure 42 : La surexpression de LZ peut sauver les défauts associés à la perte de DNAJ1 dans les cellules à cristaux circulantes.**

Les larves des génotypes indiqués ont été saignées au troisième stade de développement afin de quantifier (A) la proportion de cellules  $lz > GFP$  par rapport aux hémocytes totaux (DAPI+) et (B) leur taille.



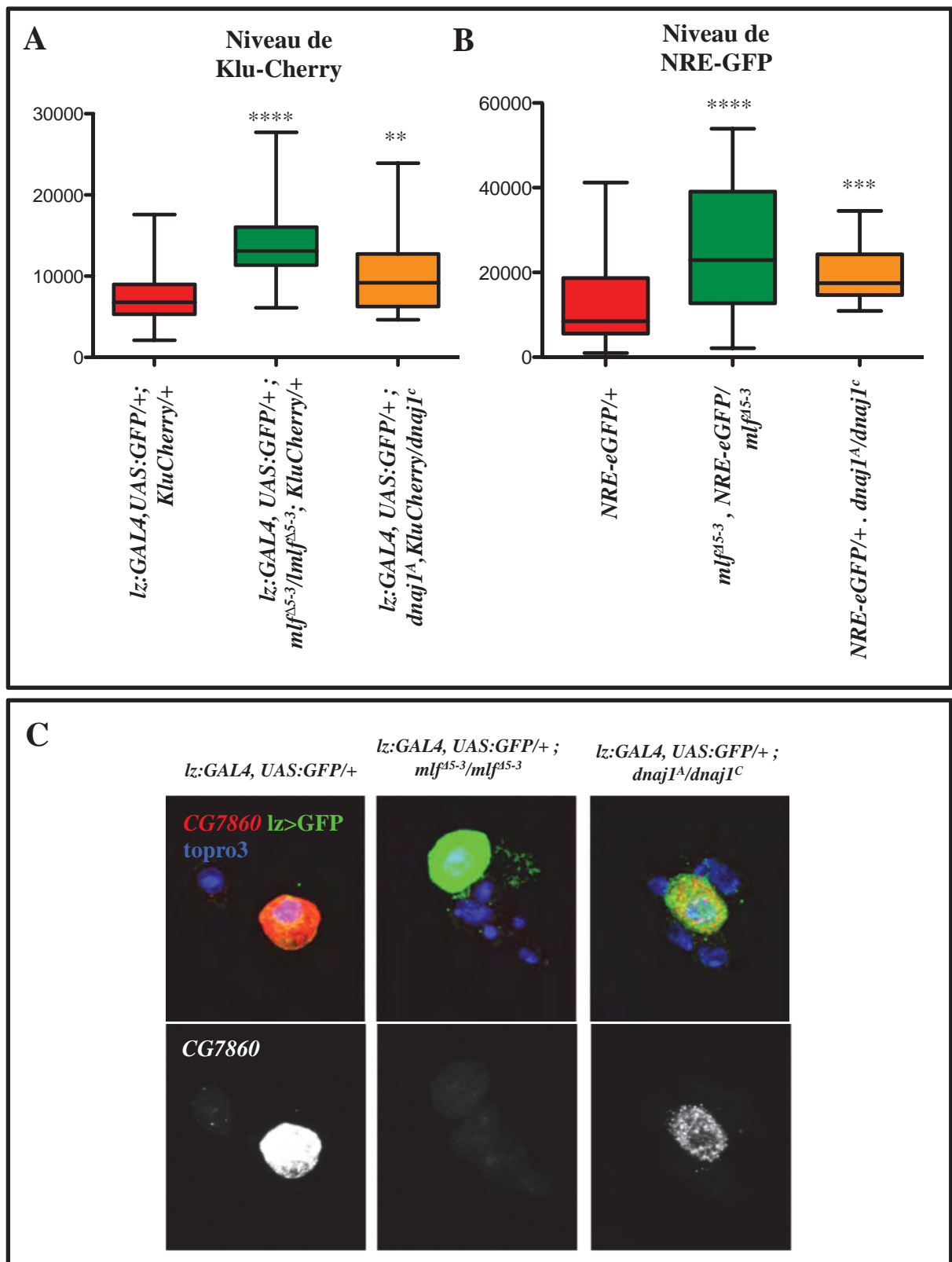
**Figure 43 : MLF et DNAJ1 interagissent génétiquement au cours du développement des cellules à cristaux circulantes larvaires.**

Les larves des génotypes indiqués ont été saignées au troisième stade de développement afin de quantifier (A) la proportion de cellules *lz>GFP+* par rapport aux hémocytes totaux (DAPI+) et (B) leur taille.

*DnaJ1*<sup>A/+</sup> on observe une augmentation significative du nombre de ces cellules qui atteint celui observé en absence de *mlf* (*mlf*<sup>Δ5-3</sup>/*mlf*<sup>Δ5-3</sup>) (**Figure 43 A**). De plus, la taille des cellules lz>GFP+ est elle aussi significativement augmentée en contexte double hétérozygote *mlf*<sup>Δ5-3/+</sup> ; *DnaJ1*<sup>A/+</sup> par rapport à *mlf*<sup>Δ5-3/+</sup> ou *DnaJ1*<sup>A/+</sup> (**Figure 43 B**). Une interaction génétique similaire est également observée entre *mlf*<sup>Δ5-3</sup> et la déficience couvrant *DnaJ1* (*mlf*<sup>Δ5-3/+</sup> ; *Def(3L)BSC884/+*) et en visualisant les cellules à cristaux grâce au transgène Bc:GFP (**non montré**).

Etant donné que la perte de *mlf* dans le lignage des cellules à cristaux s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la voie Notch, j'ai aussi analysé l'activité de cette voie dans un contexte mutant pour *DnaJ1*. L'utilisation des rapporteurs de la voie de signalisation Notch Klu:Cherry (**Figure 44 A**) et NRE:eGFP (**Figure 44 B**) montre que cette voie est suractivée dans les cellules à cristaux circulantes des larves mutantes pour *DnaJ1*. Tout comme MLF, DNAJ1 semble donc avoir un effet inhibiteur, direct ou indirect, sur la voie de signalisation Notch. De plus, des expériences d'hybridation *in situ* suggèrent que l'expression de *CG7860*, un gène identifié lors de l'approche transcriptomique comme étant fortement réprimé dans les cellules LZ+ en absence de MLF, est également diminuée dans ces cellules en absence de *DnaJ1* (**Figure 44 C**). Pour la voie Notch comme pour l'expression de *CG7860*, on notera encore une fois que l'effet de la perte de *mlf* est plus fort que celui associé à la perte de *DnaJ1*.

L'ensemble de ces données indique que MLF et DNAJ1 possèdent des fonctions communes et semblent agir de concert pour contrôler le développement des cellules à cristaux.



**Figure 44 : DNAJ1 régule négativement la voie de signalisation Notch et positivement CG7860.**

(A) Quantification des niveaux de Klu-Cherry (A) ou de NRE-GFP dans les cellules exprimant *lz>GFP* (pour Klu-Cherry) ou *Bc* (pour NRE-eGFP), dans les contextes génétiques indiqués. (C) Hybridation *in situ* contre *CG7860* et immunomarquage contre la GFP dans les hémocytes circulants des larves L3 des génotypes indiqués. Le Topro3 est utilisé pour visualiser le noyau des cellules.



# ***DISCUSSION***

## **I. Synthèse des résultats**

Les résultats obtenus en culture cellulaire montrent que MLF s'associe à DNAJ1 et à son partenaire HSC70-4. Ces protéines interagissent avec LZ et régulent son activité ainsi que son niveau d'expression en agissant au niveau post-transcriptionnel. Mes données indiquent également que MLF stabilise LZ en le protégeant de la dégradation d'une manière qui semble indépendante du protéasome. *In vivo*, chez la larve de Drosophile, MLF régule le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes en agissant sur le niveau de LZ. La perte de fonction de *DnaJ1* récapitule partiellement certains des phénotypes observés dans le lignage LZ+ des larves mutantes pour *mlf* avec notamment une augmentation du nombre et de la taille des cellules à cristaux. De plus *DnaJ1* et *mlf* interagissent génétiquement pour contrôler le développement de ce lignage. Enfin, MLF, DNAJ1 et le niveau de LZ régulent la voie de signalisation Notch qui est connue pour réguler le nombre et la différenciation des cellules à cristaux.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats amène à proposer que MLF, DNAJ1 et HSC70-4 forment un complexe « chaperon » permettant de réguler positivement l'activité de LZ et de contrôler le nombre ainsi que l'état de différenciation des cellules à cristaux circulantes potentiellement via la voie de signalisation Notch. Des expériences complémentaires seraient cependant nécessaires pour valider et affiner ce modèle.

## **II. Discussion et perspectives**

### **II.A. Le complexe MLF/DNAJ1/HSC70-4 et LZ**

Mes résultats d'immunoprécipitation en culture cellulaire montrent que MLF, LZ, DNAJ1 et HSC70-4 sont capables d'interagir entre eux. Cette approche ne permet cependant pas de déterminer si ces interactions sont directes ou indirectes et si toutes ces protéines peuvent s'associer au sein d'un même complexe. A priori, on peut s'attendre à ce que le co-chaperon DNAJ1 interagisse directement avec le chaperon HSC70-4 via son domaine J N-terminal. De plus, le fait que DNAJ1 ait été identifié comme partenaire potentiel de MLF dans un crible double hybride à grande échelle suggère que l'interaction pourrait être directe,

même si on ne peut pas exclure qu'une protéine présente dans la levure serve d'intermédiaire (Formstecher et al., 2005). Des expériences de pull down avec des protéines purifiées à partir de *E. coli* et/ou traduites *in vitro* pourraient permettre d'identifier les facteurs qui interagissent directement entre eux et les domaines protéiques impliqués dans ces interactions. Il est à noter que l'identification des domaines d'interaction pourra également être utile pour tester si ces interactions sont nécessaires pour la régulation du niveau et de l'activité de LZ. Il serait aussi intéressant de tester si la déplétion par RNAi de MLF, DNAJ1 ou HSC70-4 modifie les interactions entre les autres facteurs ou avec LZ.

D'autre part, nous n'avons pas testé si ces protéines interagissent aussi *in vivo*. Des expériences d'immunoprécipitation à partir de cellules sanguines larvaires sont difficilement envisageables du fait de la faible quantité de matériel biologique disponible et de l'absence d'anticorps dirigés contre certaines de ces protéines. L'étude de ces interactions pourrait être poursuivie *in vivo* dans les cellules à cristaux circulantes par BiFc (Bimolecular Fluorescence Complementation) (Hudry et al., 2011) en générant des lignées transgéniques permettant d'exprimer chacune de ces protéines fusionnées à une partie de la GFP.

## **II.B. Fonction moléculaire de MLF : un (co)chaperon ?**

L'interaction forte que j'ai mise en évidence entre MLF et DNAJ1 ou HSC70-4 laisse penser que MLF pourrait faire partie d'un complexe chaperon de type DNAJ/HSP70. Ainsi, il serait particulièrement intéressant de déterminer par des approches biochimiques si MLF est capable de moduler l'activité du complexe DNAJ1/HSC70-4 en mesurant *in vitro* l'activité ATPasique de HSC70-4 ainsi que la capacité de ce complexe à renaturer ou à empêcher la dénaturation d'une protéine substrat modèle (par exemple la Firefly Luciferase). Mes résultats indiquent que LZ pourrait être un substrat de ce complexe mais la nature exacte de l'activité de ce complexe sur LZ reste à définir précisément. Par exemple, est ce qu'il régule la conformation de la protéine LZ néo-synthétisée, son adressage au noyau ou la formation d'agrégats nucléaires de LZ ? L'accumulation principalement nucléaire de MLF et DNAJ1 dans les cellules suggère un rôle dans ce compartiment cellulaire mais je n'ai pas pu mettre en évidence d'effet de l'inhibition par RNAi de MLF ou DNAJ1 sur la localisation de LZ ou sur sa solubilité (**résultats non montrés**).

Il serait intéressant aussi de déterminer si, dans les Kc167, le complexe MLF/DNAJ1/HSC70-4 est impliqué dans la régulation de la stabilité d'autres protéines,

notamment des protéines connues pour former des agrégats. En effet, la surexpression de MLF, DNAJ1 et de certaines protéines HSP70 permet de supprimer la cytotoxicité associées à l'agrégation de protéines polyQ chez la Drosophile et les mammifères (Chan et al., 2000; Fayazi et al., 2006; Fernandez-Funez et al., 2000; Gibbs et Braun, 2008; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2000; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2002; Kim et al., 2005). De manière intéressantes, l'Ataxin-2, impliquée chez la Drosophile et l'Homme dans des pathologies polyQ (l'ataxie spino-cérébelleuse de type 2 et la sclérose amyotrophique latérale) (van den Heuvel et al., 2014), a également été identifiée en tant que partenaire de MLF lors de l'approche de spectrométrie de masse. Ainsi, ce complexe chaperon pourrait jouer un rôle dans le développement de pathologies neurodégénératives associées à l'agrégation de protéines. Grâce au mutant de *DnaJ1* que j'ai généré, l'interaction fonctionnelle entre *mlf* et *DnaJ1* dans ce processus pourra être étudiée.

La recherche des partenaires physiques de MLF en spectrométrie de masse a également révélé d'autres candidats dont il serait intéressant de poursuivre l'étude. Par exemple, dans les 3 expériences de spectrométrie de masse on retrouve les protéines TWS, une sous unité régulatrice de la protéine phosphatase PP2A, la petite protéine de choc thermique HSP23, la protéine de liaison à l'ARN SQD, et la protéine de rétrotransposon GIP. Les expériences de dsRNA sur certains de ces candidats ne m'ont pas permis d'établir un lien avec la régulation du niveau de LZ culture de cellules (**résultats non montrés**), mais ces protéines pourraient participer à d'autres aspects de la fonction de MLF qui reste à identifier.

## **II.C. MLF et contrôle du niveau de LZ**

Les résultats que j'ai obtenus indiquent que MLF (ainsi que DNAJ1 et HSC70-4) régule post-traductionnellement le niveau de LZ en permettant de le stabiliser. Mes résultats suggèrent également que la dégradation de LZ en absence de MLF est indépendante du protéasome mais le mécanisme de dégradation mis en jeu reste inconnu. Chez les mammifères il a été montré que p53 peut être dégradé par un mécanisme indépendant du protéasome mettant en jeu des protéases spécifique, les calpaines (Tao et al., 2013). Chez la Drosophile, il existe trois gènes codants pour des calpaines notés A à C. La calpaine B a été identifiée en tant que suppresseur de la létalité induite suite à l'expression de RUNX1-ETO dans le domaine LZ+ (Osman et al., 2009) et les résultats que j'ai obtenus en traitant les cellules Kc167 avec des dsRNA contre la calpaine B ne m'ont pas permis de mettre en évidence un

rôle de cette cystéine protéase dans la régulation du niveau de LZ (résultats non montrés). Il serait néanmoins intéressant de tester le rôle des calpaines A et C par dsRNA ou de tester l'effet d'inhibiteurs génériques des cystéines protéases (leupeptin, pepstatin A, E64). Alternativement, il est possible que LZ soit dégradée par voie lysosomale. En effet, en plus de réguler la dégradation des protéines par le protéasome, les protéines chaperons de la famille HSP70 peuvent réguler la dégradation des protéines par des mécanismes d'autophagie. Ces mécanismes appelés CMA (Chaperone Mediated Autophagy) et CASA (chaperone-assisted selective autophagy) sont impliqués dans la dégradation des protéines qui sont sous forme d'agrégats et sont respectivement indépendant et dépendant de l'ubiquitinylation (Kettern et al., 2010). On peut imaginer qu'en absence de MLF, DNAJ1 ou HSC70-4, le processing de LZ par le complexe chaperon soit bloqué et cause une accélération de sa dégradation par CMA ou CASA. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de l'autophagie dans la régulation du niveau de LZ en utilisant par exemple des inhibiteurs des lysosomes (NH<sub>4</sub>Cl ou chloroquine) ou de l'autophagie (3-méthyladénine) ainsi que des dsRNA ciblant des acteurs spécifiques des ces voies. Pour terminer, il est possible que MLF agisse à différents niveaux pour réguler LZ post-transcriptionnellement : non seulement en régulant sa stabilité/demi-vie mais aussi en contrôlant sa traduction et/ou sa conformation/solubilité (cf ci-dessus).

#### **II.D. DNAJ1 et le contrôle de LZ *in vivo***

Les résultats obtenus en culture de cellules indiquent que DNAJ1 régule post-transcriptionnellement le niveau de LZ. Cependant *in vivo*, le niveau de LZ observé par immunofluorescence ne semble pas diminuer dans les cellules à cristaux des larves mutantes pour *DnaJ1*, bien que ces cellules présentent des caractéristiques communes avec celles observées quand le niveau de LZ est réduit (larves mutantes *mlf* ou hypomorphes *lz* ; cf ci-dessus). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, il est possible que dans le mutant *DnaJ1* les phénotypes hématopoïétiques observés soient indépendants de LZ. Cette hypothèse est cependant en désaccord avec les résultats que j'ai obtenus et qui suggèrent que ces phénotypes sont sauvés en surexprimant LZ dans le lignage LZ+. Deuxièmement, un problème de sensibilité de la technique d'immunofluorescence est envisageable. Les phénotypes associés à la perte de *DnaJ1* sont globalement plus faibles que ceux que l'on observe en absence de *mlf* (*in vivo* mais aussi en culture cellulaire), il est donc possible que la différence d'expression de LZ ne soit pas détectable par immunofluorescence.

Une analyse par western blot pourrait être plus sensible mais est difficilement réalisable avec les faibles quantités de cellules sanguines LZ+ que l'on peut collecter. Troisièmement, il est envisageable qu'*in vivo* certaines protéines possèdent des fonctions redondantes avec DNAJ1 concernant la régulation de LZ et que ces protéines ne soient pas exprimées dans les cellules Kc167. Les résultats que j'ai obtenus en qRT PCR concernant *CG5001*, phylogénétiquement le plus proche de *DnaJ1*, suggèrent d'ailleurs qu'il n'est pas ou peu exprimé dans les cellules Kc167 alors qu'il est exprimé dans les cellules à cristaux circulantes d'après nos données de RNAseq. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de *CG5001* dans les cellules à cristaux et notamment de tester si dans le double mutant *dnaj1/CG5001* une diminution du niveau de LZ est observée. Cependant aucun allèle mutant pour *CG5001* n'est actuellement disponible pour tester cette hypothèse. Quatrièmement et pour terminer la régulation de LZ pourrait être différentes *ex vivo* dans les cellules Kc167 qui n'expriment normalement pas LZ et *in vivo* dans les cellules LZ+ circulantes. Il est possible par exemple qu'en absence de *DnaJ1*, LZ soit mal replié et forme des agrégats qui sont protégés de la dégradation par MLF quand celui-ci est fortement exprimé dans le noyau, comme c'est le cas dans les cellules à cristaux, alors qu'ils sont dégradés dans les cellules Kc167 où la protéine MLF endogène est exprimée plus faiblement. De plus d'autres facteurs exprimés spécifiquement dans les cellules à cristaux ou dans les cellules Kc167 pourraient réguler le destin final des protéines LZ mal repliées.

Un enjeu important sera de réussir à trancher entre ces différentes hypothèses pour savoir si MLF et un système chaperon/co-chaperon de type DNAJ/HSP70 forment bien un complexe impliqué dans la régulation du niveau de LZ *in vivo* et de déterminer son mode d'action précis.

## **II.E. Mécanismes de régulation du nombre et de la taille des cellules à cristaux par MLF et LZ**

Mes résultats indiquent que la régulation de niveau de LZ par MLF est un élément crucial dans le contrôle du développement du lignage des cellules à cristaux. En effet, en absence de *mlf*, le nombre et la taille des cellules à cristaux augmentent alors que le niveau de LZ diminue. De façon importante, ces phénotypes sont aussi observés dans des larves hypomorphes pour *lz* et sont sauvés par la ré-expression de LZ (ou de MLF) dans les cellules LZ+ des larves mutantes pour *mlf*. Les mécanismes mis en jeu dans le contrôle du nombre et de la taille/état de différenciation des cellules à cristaux dans ces contextes restent cependant à

être décryptés. Différentes hypothèses permettent d'expliquer comment MLF pourrait contrôler de manière cellulaire autonome le développement des cellules à cristaux.

### **II.E.1. La voie JNK**

Il a été démontré que, sous l'action de la voie de signalisation JNK, les cellules à cristaux matures « éclatent » et libèrent les prophénoloxidases dans l'hémolymphe (Bidla et al., 2007). Ainsi, il est possible que, dans un mutant *mlf*, la voie JNK soit inhibée et donc que les cellules à cristaux ne se rompent pas ce qui pourrait provoquer une accumulation de cellules à cristaux de grande taille. Il serait donc intéressant de déterminer si en absence de MLF la rupture des cellules à cristaux est affectée ou si la voie de signalisation JNK est dérégulée. Il a été montré récemment qu'un gain de fonction de MLF dans l'aile s'accompagne d'une activation de la voie JNK et que MLF peut se lier via DREF par activer l'expression de *basket* (*Drosophila JNK*) (Yanai et al., 2014), mais notre analyse transcriptomique des cellules LZ+ dans les larves mutantes pour *mlf* n'a pas révélé de modifications significatives de l'expression des composants de la voie JNK. De plus, des données obtenues au laboratoire (V. Gobert, communication personnelle) suggèrent qu'une inhibition de la voie JNK n'est pas suffisante pour causer une augmentation du nombre ou de la taille des cellules à cristaux circulantes.

### **II.E.2. La prolifération et l'apoptose**

L'augmentation du nombre de cellules à cristaux pourrait être due à une augmentation de la prolifération. Bien qu'au stade L3 les cellules LZ+ *mlf*<sup>-/-</sup> possèdent plutôt des traits caractéristiques des cellules à cristaux différenciées exacerbés, une différenciation plus lente de ces cellules (due à une diminution de l'expression de LZ ?) pourrait leur laisser une fenêtre de temps plus grande pour proliférer. A ce jour, il n'a jamais été observé qu'une cellule LZ+ larvaire puisse se diviser (Krzemien et al., 2010; Leitão et Sucena, 2015; Makhijani et al., 2011), mais il pourrait y avoir une réactivation du programme de prolifération cellulaire en absence de *mlf*. En effet, MLF interagit avec DREF, qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle mitotique et l'endoréplication (Matsukage et al., 2008; Ohno et al., 2000). Là encore, nos données de RNAseq ne nous ont pas permis de mettre en évidence de cibles de DREF (telles que *PCNA*, *cycA*, *e2F1*, *DNAPol a*) dont l'expression serait modifiée en absence de *mlf*. De hauts niveaux de LZ (*i.e.* en condition normale) pourraient également induire l'apoptose d'une partie des cellules LZ+ comme cela a été décrit dans l'œil



(Wildonger et al., 2005). Cependant, l'expression ectopique d'un inhibiteur de l'apoptose (p35) dans les cellules LZ+ n'induit pas d'augmentation du nombre de cellules à cristaux circulantes (**L. Waltzer, données non publiées**), suggérant que le nombre de ces cellules n'est pas régulé par cette voie.

### **II.E.3. La voie Notch**

J'ai pu mettre en évidence une augmentation de l'activité de rapporteurs de la voie Notch dans les cellules à cristaux mutantes *mlf*<sup>-/-</sup>, *DnaJ1*<sup>-/-</sup> ou hypomorphes pour *lz*. De plus, les résultats de notre analyse transcriptomique montrent une augmentation de l'expression de certaines cibles de la voie Notch dans le lignage des cellules à cristaux dont *Notch*, *CG32369*, *peb/Hnt* ou *E(spl)-m3* (Terriente-Felix et al., 2013). Il a été démontré que la voie de signalisation Notch contrôle le nombre et l'état de différenciation des cellules à cristaux (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003; Mukherjee et al., 2011; Terriente-Felix et al., 2013) et que, dans les ilots sessiles, les plasmacytes sont capables de se transdifférencier en cellules à cristaux grâce à l'action de la voie de signalisation Notch (Leitão et Sucena, 2015). L'hyperactivation de cette voie pourrait donc être à l'origine de l'augmentation du nombre et de la taille des cellules à cristaux circulantes. Comme l'activation de Notch dans les précurseurs des cellules à cristaux précède l'induction de l'expression de *lz* (Leitão et Sucena, 2015), et que les phénotypes des larves *mlf* (ou *DnaJ1*) sont sauvés en re-exprimant LZ ou MLF (ou DNAJ1) avec le pilote *lz-GAL4*, il est probable que ce soit une augmentation cellulaire-autonome de l'activité de la voie Notch dans les cellules LZ+ qui soit mise en jeu plutôt qu'une augmentation du nombre de cellules à cristaux spécifiés (par transdifférenciation des plasmacytes). Dans les cellules LZ+, le maintien de l'activation de la voie Notch promeut leur endoréplication et donc augmente leur taille (Terriente-Felix et al., 2013) et permettrait d'accroître leur nombre en inhibant leur rupture (Mukherjee et al., 2011). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si l'augmentation du nombre et de la taille des cellules à cristaux circulantes en contexte mutant pour *mlf* ou *DnaJ1* ou hypomorphe pour *lz* peut être supprimée en diminuant l'activité de la voie Notch dans les cellules LZ+.

Ensuite, il serait intéressant de comprendre comment cette voie est suractivée dans ces contextes. Nos données de RNAseq montrent que l'expression de plusieurs protéines régulant le statut redox des cellules est affecté en absence de *mlf*, avec notamment une activation de l'expression de l'oxidoreductase CDR, impliquée dans la production de ROS, mais aussi d'enzymes de détoxification telles que la peroxiredoxine *Jafrac1* ou les glutathiones

transférases dont l'expression est induite en conditions de stress oxydant (Sykiotis et Bohmann, 2008). Or il a été montré qu'une augmentation du niveau de ROS peut stabiliser Notch (Mukherjee et al., 2011). Il serait donc intéressant de tester si une modification du niveau de ROS participe aux phénotypes causés par la perte de *mlf*, *DnaJ1* ou *lz*.

## **II.F. MLF : un régulateur clé de l'expression génique dans les cellules à cristaux**

Dans le but de comprendre comment *mlf* régule le nombre et la différenciation des cellules à cristaux circulantes nous avons établi leur transcriptome en contexte sauvage ou mutant pour *mlf*. L'analyse de ces transcriptomes a révélé que de nombreux gènes sont dérégulés en absence de *mlf* mais n'a pas permis de dégager de façon évidente une signature moléculaire qui révèle la dérégulation d'une voie de signalisation ou d'un processus impliqué dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose, de la croissance ou de la différenciation des cellules à cristaux. Il est possible qu'au stade larvaire L3, stade auquel ont été réalisés les transcriptomes (102h  $\pm$  6h de développement), il soit trop tard pour observer l'effet de MLF sur le développement des cellules à cristaux. En effet, des cellules à cristaux larvaires sont spécifiées dans la larve durant toute la durée du stade L3 (Leitão et Sucena, 2015) et ce processus commence probablement encore avant (Lanot et al., 2001; Lebestky et al., 2000) ; il est donc possible qu'au stade observé, on ait une population hétérogène de cellules à cristaux (jeunes/vieilles) et que, pour comprendre comment MLF agit, il faille réaliser le transcriptome (et d'autres analyses) plus tôt au cours du développement larvaire. Cependant, la quantité d'ARNm obtenue à partir des cellules LZ+ était déjà limitante à 102h et donc le faible nombre de cellules LZ+ présentes dans des larves plus jeunes rendrait cette approche encore plus difficile.

Cette analyse transcriptomique montre néanmoins que *mlf* est requis pour l'expression normale d'environ 500 gènes et qu'il affecte tout particulièrement l'expression de gènes spécifiques des cellules à cristaux. C'est donc un régulateur majeur de la transcription dans ce lignage. Toutefois, de manière surprenante, alors que le niveau de protéine LZ diminue dans les cellules à cristaux *mlf*<sup>-/-</sup>, l'expression de gènes cibles connus de LZ tels que *mpo* et *Bc* ne semble pas dérégulée. Ce résultat, qui est confirmé par hybridation *in situ* et immunomarquage contre *mpo* (dans les larves *mlf*<sup>-/-</sup> mais aussi dans des larves hypomorphes pour *lz*), suggère qu'un faible niveau de LZ est suffisant pour induire la transcription de ses

cibles. On peut aussi penser que la diminution du niveau de LZ est en partie compensée par l'augmentation de l'activité de la voie Notch, qui collabore avec LZ pour induire l'expression de certains gènes (Terriente-Felix et al., 2013). Alternativement, il est possible qu'à partir d'un certain stade de maturation des cellules à cristaux, l'expression de ces gènes devienne (en partie ?) indépendante de LZ et soit assurée par un autre facteur de transcription qui assurerait le relais. Une étude très récente montre que parmi les gènes les plus activés suite à la surexpression de Hnt dans le disque d'œil (où est aussi exprimé LZ) on retrouve *Bc* et *mpo* (Oliva et al., 2015). Il est donc tentant de proposer que ce facteur de transcription puisse compenser la diminution de LZ pour l'activation de ces gènes.

## **II.G. Fonctions de DNAJ1 *in vivo* : un régulateur de l'hématopoïèse et plus ?**

Grâce au mutant nul de *DnaJ1* que j'ai généré par la technique CRISPR/Cas9, j'ai pu montrer que ce gène est requis pour le développement normal des cellules à cristaux circulantes et interagit génétiquement avec MLF au cours de ce processus. Le fait que l'augmentation du nombre et de la taille des cellules à cristaux des larves *DnaJ1<sup>A/C</sup>* puisse être sauvée en ré-exprimant DNAJ1 dans les cellules LZ+ démontre que ces phénotypes sont bien dus à la perte de *DnaJ1* et que DNAJ1 agit postérieurement à l'induction du destin cellules à cristaux. Ces résultats suggèrent aussi fortement que DNAJ1 agit de façon cellulaire autonome, mais une publication récente montre que DNAJ1 (et aussi hDNAJB1 et d'autres chaperons) peut être sécrétée par la voie des exosomes et peut agir aussi de façon non-cellulaire autonome (Takeuchi et al., 2015). On notera toutefois, que DNAJ1 semble principalement nucléaire dans les cellules à cristaux, ce qui renforce l'idée d'une fonction cellulaire autonome. En plus des cellules sanguines larvaires circulantes sur lesquelles je me suis concentré, il serait à présent intéressant d'étudier le rôle de DNAJ1 au cours de l'hématopoïèse embryonnaire pour déterminer notamment si, comme MLF, DNAJ1 est nécessaire pour le maintien des cellules à cristaux à ce stade, mais aussi d'étudier sa fonction dans la glande lymphatique et dans le système hématopoïétique adulte. Le rôle de HSC70-4 (ou d'autres protéines de cette famille) dans les cellules à cristaux circulantes dans un premier temps puis plus généralement au cours de l'hématopoïèse mériterait lui aussi d'être étudié.

Mis à part son implication dans la suppression de la cytotoxicité associées aux protéines polyQ et mes données montrant son rôle dans l'hématopoïèse, on sait encore très peu de choses sur les fonctions de DNAJ1. Mes données montrent que *DnaJ1* n'est pas

absolument requis pour la viabilité des *Drosophiles*. Il est possible cependant que DNAJ1 ait des fonctions redondantes avec d'autres Hsp40 de classe II, telles que CG5001 ou MRJ. DNAJ1 pourrait jouer un rôle dans la réponse au choc thermique : c'est une cible directe de HSF dont l'expression est induite suite à un choc thermique (Birch-Machin et al., 2005; Gonsalves et al., 2011), la déplétion de DNAJ1 dans les cellules SL2 promeut l'expression de protéines de choc thermique (Marchler et Wu, 2001) et plusieurs études suggèrent une association entre le niveau d'expression de DNAJ1 et la tolérance au froid (Carmel et al., 2011; Colinet et al., 2010; Colinet et al., 2013). La disponibilité d'un allèle mutant nul pour *dnaj1* devrait maintenant faciliter la caractérisation de ses fonctions au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme chez la *Drosophile*.

## **II.H. Conservation**

Mes résultats montrent qu'une diminution du niveau de LZ s'accompagne d'un phénotype que l'on pourrait qualifier de pré-leucémique caractérisé par une surproduction de cellules à cristaux (mal) différenciées. Ces données sont à rapprocher de celles qu'on observe chez les patients atteints de FDP/AML (familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia), une maladie haploinsuffisante due à la mutation germinale d'un allèle de *RUNX1* (Liew et Owen, 2011). Ces patients présentent une thrombocytopénie causée par un défaut de maturation des mégakaryocytes dont la différenciation dépend du niveau RUNX1, et évoluent fréquemment vers une leucémie. Ainsi, malgré des différences qui existent entre ces deux systèmes, on peut espérer que l'étude des cellules à cristaux puisse apporter des informations nouvelles sur le processus de transformation oncogénique lié à la dose de RUNX.

Il a précédemment été démontré que la régulation du niveau de RUNX est une caractéristique conservée des protéines MLF (Bras et al., 2012). En particulier, l'absence de MLF entraîne un sauvetage de la létalité et des phénotypes hématopoïétiques induits suite à l'expression de la protéine leucémogène humaine RUNX1-ETO dans le lignage LZ+ (Bras et al., 2012). Ainsi, bien que je n'ai pas pu mettre en évidence de diminution du niveau de LZ dans les cellules LZ+ circulantes en absence de DNAJ1, il serait intéressant de déterminer si l'absence de DNAJ1 est capable de sauver les phénotypes hématopoïétiques induits par RUNX1-ETO et s'il régule le niveau d'expression de cette protéine. Par la suite, on pourrait chercher à savoir si les homologues de DNAJ1 chez l'Homme (DNAJB4 et DNAJB6)

contrôlent aussi le niveau et/ou l'activité des protéines RUNX, notamment dans les cellules sanguines normales ou leucémiques.

En fait, le rôle des homologues de DNAJ1 et de MLF chez les mammifères reste globalement à être mis à jour. Il sera particulièrement intéressant de savoir si le lien fonctionnel que j'ai mis en évidence entre ces protéines chez la *Drosophile* est conservé, non seulement pour ce qui concerne le développement des cellules sanguines ou des leucémies mais aussi dans le cadre des maladies neurodégénératives, pathologies dans lesquelles ces deux familles de protéines ont été impliquées.

***MATERIELS ET***  
***METHODES***

### **Lignées de Drosophiles et croisements :**

Les lignées suivantes ont été utilisées : *dMLF<sup>Δ5-3</sup>*, *dMLF<sup>ΔC1</sup>*, *UAS-mlf* (Martin-Lannerée et al., 2006), *UAS-lz*, *lz-GAL4*, *UAS-mCD8-GFP*, *Def(exel)7138 P{EPgy2}DnaJ-1<sup>EY04359</sup>*, *UAS-DnaJ-1*, *Def(3L)BSC884* (Bloomington Stock Center), *klumpfuss:Cherry*, (Terriente-Felix et al., 2013) ; *NRE :eGFP* (Housden et al., 2012). *Bc-GFP* (Tokusumi et al., 2009).

Les croisements ont été réalisés à 25°C sur un milieu à mouche standard (Agar- levure- farine de maïs- sucrose).

### **Immunofluorescence**

Les larves L3 (femelles, sauf indication contraire) sont saignées comme décrit dans Osman et al., 2009 et les hémocytes de 4 larves minimum (ou les cellules Kc167) sont collectés sur une lamelle dans 1 ml de PBS contenu dans un puits d'une plaque P24 de culture cellulaire (P24). Les plaques sont centrifugées 3 min à 1000 rpm et les échantillons sont fixés 20 minutes dans de la paraformaldéhyde 4%. Après trois lavages dans du PBS-0.3% triton et un blocage de 30 minutes dans du PBS-0.3% triton 1% BSA, l'anticorps primaire (est incubé à 4°C sur la nuit dans du PBS-0.3% triton 1% BSA. Après trois lavages dans du PBS-0.3% triton, l'anticorps secondaire couplé aux alexa fluo 488, 555 ou 647 (Molecular Probes) est incubé pendant une heure. Après trois lavages dans du PBS-0.3% triton et un lavage dans du PBS les hémocytes circulants sont montés dans du Vectashield après avoir préalablement marqué es noyau au DAPI ou avec du Topro3. Pour les glandes lymphatiques, celles-ci sont disséquées à partir de larves L3 et collectées dans du PBS. Les étapes de fixation, de marquage avec les anticorps et de montage sont globalement identiques à celles suivies pour les hémocytes circulants. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : souris anti-LZ, anti-Antp, anti-Hnt (Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB), lapin anti-MLF (Fouix et al., 2003), lapin anti-PPO1 (Li et al., 2012), souris anti-COL (Crozatier et al., 2004), lapin anti-DNAJ1 (Marchler et Wu, 2001), lapin ou souris anti-GFP (Torrey Pines ou Roche), souris anti-mCherry (Abcam); souris anti-HA et souris anti-V5 (Sigma).

Les images ont été acquises sur un microscope confocal Leica SP2 ou SP5 ou sur un microscope à épifluorescence Zeiss. Les quantifications d'intensité du signal LZ et de taille des cellules ont été réalisées sous ImageJ. Pour l'analyse des glandes lymphatiques, les différentes quantifications ont été réalisées comme indiqué dans Benmimoun et al., 2012.



### **Hybridation *in situ***

Des sondes ARN anti-sens dirigées contre *tepIV*, *mpo*, *Jafrac*, *oscillin CG7860* ou *CG6733* marquées avec de la DIG ont été utilisées pour réaliser les hybridations *in situ* comme décrit dans Avet-Rochex et al., 2010. Brièvement : les glandes lymphatiques (disséquées ou les cellules circulantes issues de saignée de larves L3 sont collectées dans du PBS, fixées 20 minutes dans de la paraformaldéhyde 4% et stockées puis rincées et perméabilisées dans du PBS- 0,3% Triton. Les échantillons sont ensuite pré-incubés 1H à 65°C dans un tampon d'hybridation (HB) puis incubées à 65°C sur la nuit la sonde DIG ARN dans du tampon HB. Après 2 lavages à 65° dans du HB, les échantillons sont lavés dans du PBS-0.3% triton, bloqués dans du PBS-0.3% triton 1% BSA et incubés 2 H avec l'anticorps primaire anti-DIG (1/2000 ; Roche) à température ambiante. Le signal d'hybridation *in situ* est révélé avec du fast-red (Roche) et suite à trois lavages dans du PBS-0.3% triton les lames sont montées dans du Vectashield. Pour l'immunofluorescence couplée à l'hybridation *in situ*, suite au dernier lavage, les glandes lymphatiques sont bloquées dans du PBS-0.3% triton 1% BSA et traitées comme décrits ci-dessus avec l'anticorps primaire puis secondaire d'intérêt.

### **Culture cellulaire, traitement dsRNA et transfection**

Les cellules Kc167 sont mises en culture à 25°C dans un milieu Schneider (Invitrogen) complémenté avec 10% de serum fetal de bœuf (FBS) et 50 µg de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Pour les traitements dsRNA, les cellules sontensemencées à 1 million de cellules par ml. 24 H après elles sont incubées avec un dsRNA (16 µg/puits pour une plaque 6 puits, 8 µg pour une 12 puits) dans du Schneider sans sérum pendant 40 min puis du schneider 10% FBS pénicilline/streptomycine est ajouté. Après 24 H d'incubation les cellules sont transfectées avec les plasmides d'intérêt par Effectène (Qiagen) puis collectées 72 H après afin d'extraire les protéines ou les ARNm.

Pour le calcul de la demi-vie de LZ, de la cycloheximide (50 µg/ml) est ajoutée 6H, 4H et 2H avant la collecte des cellules.

### **Extraction d'ARN, réverse transcription et RT-qPCR**

Les cellules sont collectées et les ARN sont extraits à l'aide du Kit RNeasy (Qiagen). 1 µg d'ARN est rétrotranscrit avec de la Superscript II (Invitrogen) et 10 µl d'ADNc d'une dilution au 1/300 sont utilisés comme matrice pour la qRT PCR (Sybr green Jumpstart *Taq* ready mix ; Sigma-Aldrich). Les moyennes et les écarts types ont été calculés à partir de triplicats biologiques indépendants.

### **Extraction de protéines, immunoprécipitation et Western Blot**

Les cellules sont collectées et lysées 30 min sur glace dans 100 µl de tampon RIPA (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8 supplémenté en inhibiteurs de protéases (Roche)) ou 100 µl de tampon IP ((150 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8, 1mM EGTA, supplémenté en inhibiteurs de protéases (Roche)) pour les immunoprécipitation. Après centrifugation à 13000g à 4°C pendant 15 min, les protéines présentes dans le surnageant sont dosées, séparées (50 µg de protéines) par SDS PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite lavée dans du PBS1X puis bloquée avec une solution PBS/Tween20/Lait10%. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS/Tween/Lait 1% et après une nuit d'incubation, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase 45min à température ambiante. Les western-blots ont été révélés par photoluminescence (Kit ECL ; Pierce). Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-V5 (Invitrogen), anti-tubuline (Sigma-Aldrich), anti-Rénilla (Cliniscience), anti-HA (Sigma), anti-MLF, anti-GFP, anti-DNAJ1, anti-SRP (B. Augé). Les quantifications sont réalisées sous ImageJ.

Pour les immunoprécipitations : les protéines (1mg) sont pré-adsorbées dans du tampon IP avec 60 µl de billes sépharoses couplées à la protéine A ou G pendant 1H à 4°C et immunoprécipitées dans du tampon IP à 4°C sur la nuit avec 1 µg d'anticorps et 20 µl de billes sépharose. Les billes sont lavées dans du tampon IP et les protéines immunoprécipitées sont déposées sur gel SDS-PAGE et révélées par western-blot.

### **Tests Luciférase**

Les cellules Kc167 traitées ont étéensemencées en plaque 96 puits, incubées avec 1µg de dsRNA puis transfectées avec 55 ng du rapporteur p4X-PO45-Fluc (Gobert et al., 2010) , 20 ng de pAc-Rluc et 10 ng de pAc-Lz-V5 par puits. Les cellules sont lysées 72H après transfection et les activités Firefly et Renilla luciférase sont mesurées en utilisant le système Dual luciferase reporter assay (Promega).

### **Spectrométrie de masse**

Pour la spectrométrie de masse, la lignée stable Kc167 pMT-MLF-V5-His ou de la lignée parentale Kc167 a étéensemencée à 10<sup>6</sup> cellules/ml. L'expression de MLF-V5 a été induite en traitant les cellules 24h avec 50mM CuSO<sub>4</sub> puis les protéines ont été extraites dans du tampon IP et dosées. Les immunoprécipitations ont été réalisées à partir de 20 mg de protéines avec

200 µl de billes sépharoses couplées à l'anti-V5 (Sigma) ou 400 µl de billes magnétiques couplées à l'anti-V5 (MBL). Les échantillons ont été élués dans du tampon Laemmli. Les éluats ont été réduits (30mM DTT 5min à 95°C) puis alkylés (90mM Iodoacétamide, 30min à TA dans le noir). Les échantillons sont ensuite chargés sur gel SDS PAGE 12%, qui est coloré à l'Instant Blue. Une bande unique est découpée. Après décoloration, les protéines sont ensuite digérées par incubation des morceaux de gel avec 1µg de trypsin (Promega) dans 50 mM d'ammonium bicarbonate, à 37°C sur la nuit. Les peptides générés sont extraits des gels grâce à trois étapes : une première incubation dans 50 mM d'ammonium bicarbonate, 15 min à 37°C, et deux incubations dans 10% d'acide formique/acétonitrile (1:1), 15 min à 37°C. Les trois extraits sont regroupés avec le surnageant initial de la digestion, séchés au speed vac et resuspendus dans 17µL de 2% acétonitrile, 0.05% acide trifluoroacétique. Le mélange peptidique est ensuite analysé par nanoLC-MS/MS utilisant un système Ultimate3000-RS (Dionex) couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). 5µL de chaque échantillon est chargé sur une pré-colonne C18 (300 Tm ID x 5 mm, Dionex) à 20µL/min dans 5% acétonitrile, 0.05% acide trifluoroacétique. Après 5 min de dessalage, la pré-colonne est basculée sur la colonne analytique (75 Tm ID x 50 cm Reprosil C18, package IPBS) équilibrée dans 95% de solvant A (5% acétonitrile, 0.2% acide formique) and 5% de solvant B (80% acétonitrile, 0.2% acide formique). Les peptides sont élués par un gradient de 5 à 50% de solvant B durant 80 min à 300nL/min. Le LTQ-Orbitrap est réglé en mode d'acquisition dépendant avec le logiciel XCalibur. Survey scan MS sont acquis dans l'Orbitrap dans une gamme de masse de 350 à 1800 m/z avec une résolution de 60000. Les vingt ions les plus intenses sont sélectionnés afin d'être fragmenter par CID-MS/MS dans la trappe linéaire (LTQ). Une exclusion dynamique de 60 sec est appliquée pour éviter la re-sélection d'un peptide. Pour les différents peptides identifiés, l'interrogation de la banque Swiss-prot par Mascot Daemon a permis d'identifier les protéines présentes.

### **Transcriptome : Saignées ; FACS ; Extraction d'ARN**

Les cellules sanguines ont été collectée en saignant entre 100 et 150 larves L3 (96h-108h) du génotype *l<sub>z</sub>-GAL4,UAS-mCD8GFP/+* (contrôles) ou *l<sub>z</sub>-GAL4,UAS-mCD8GFP/+ ; mlf<sup>ΔC5</sup>/mlf<sup>ΔC5</sup>* (mutantes) dans du PBS froid pour chaque échantillon. Après filtration des 10 échantillons sur un tamis nylon de maillage 35µm (Falcon), les cellules LZ+ ont été triées par cytométrie de flux sur la base de l'expression de la GFP sur un trieur de cellule FACS Scalibur à une pression de 20psi. La première partie de l'échantillon a été récupérée et réanalysée par

FACS pour s'assurer de sa pureté. L'ARN des cellules GFP+ a ensuite été extrait en utilisant le kit Arcturus PicoPure RNA Isolation (applied biosystems).

La suite du traitement des échantillons et leur séquençage à haut débit a été réalisé par le service d'analyse Génomique de l'Université du Michigan (Detroit, USA). Après dosage et vérification de la qualité des 10 échantillons par passage sur puce Agilent Bionalyzer RNA pico, 3 échantillons contrôles et 3 échantillons mutants ont été sélectionnés pour être séquencés. Les ARN de ces échantillons ont été reverse-transcrits en ADNc et amplifiés en utilisant le kit NuGEN Ovation Ultralow conformément au protocole. La librairie pour le séquençage a été préparée avec le kit Illumina TruSeq RNA Library Prep. Suite à l'amplification les ADNc ont été fragmentés par sonication (Covaris) et la taille des fragments a été vérifiée sur puce Agilent. Les fragments ont ensuite été réparés pour obtenir des extrémités « blunt » et les adaptateurs ont été ligués par PCR pour obtenir la banque finale. Les banques ont été séquencées sur un séquenceur à haut débit Illumina HiSeq 2500 (single-end 50bp)

### **Analyses Bioinformatiques**

Les contrôles qualités initiaux des résultats de séquençage ont été réalisés avec FASTQC. Les séquences ont été filtrées pour éliminer les adaptateurs et les bases de mauvaises qualités avec Trimmomatic et revérifiées avec FASTQC. Les séquences ont ensuite été alignées sur le génome de la Drosophile (BDGP R5/dm3) avec TopHat et Bowtie2. Un tableau avec le nombre de lecture pour chaque gène annoté a été généré avec HTSeq-Count. Les étapes de normalisation de profondeur de lectures, d'estimations de variance et les analyses d'expressions différentielles (avec correction de type Benjamini et Hochberg) ont été réalisées sous R Bioconductor avec la suite DESeq. Les valeurs d'expression de chaque gène en FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million fragments) ont été calculées avec Cufflinks.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Agaisse, H. and Perrimon, N.** (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* **198**, 72-82.
- Al-Drees, M. A., Yeo, J. H., Boumelhem, B. B., Antas, V. I., Brigden, K. W., Colonne, C. K. and Fraser, S. T.** (2015). Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells Int* **2015**, 571893.
- Alfonso, T. B. and Jones, B. W.** (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* **248**, 369-383.
- Arlet, J. B., Ribeil, J. A., Guillem, F., Negre, O., Hazoume, A., Marcion, G., Beuzard, Y., Dussiot, M., Moura, I. C., Demarest, S., et al.** (2014). HSP70 sequestration by free  $\alpha$ -globin promotes ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassaemia. *Nature* **514**, 242-246.
- Arrigo, A. P.** (2005). [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* **21**, 619-625.
- Avet-Rochex, A., Boyer, K., Polesello, C., Gobert, V., Osman, D., Roch, F., Augé, B., Zanet, J., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2010). An in vivo RNA interference screen identifies gene networks controlling *Drosophila melanogaster* blood cell homeostasis. *BMC Dev Biol* **10**, 65.
- Babcock, D. T., Brock, A. R., Fish, G. S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M. A. and Galko, M. J.** (2008). Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10017-10022.
- Bajgar, A., Kucerova, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J. and Dolezal, T.** (2015). Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic switch during immune response. *PLoS Biol* **13**, e1002135.
- Bataillé, L., Augé, B., Ferjoux, G., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2005). Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* **132**, 4635-4644.
- Benmimoun, B., Polesello, C., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2015). The EBF transcription factor Collier directly promotes *Drosophila* blood cell progenitor maintenance independently of the niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 9052-9057.
- Benmimoun, B., Polesello, C., Waltzer, L. and Haenlin, M.** (2012). Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development* **139**, 1713-1717.
- Bidla, G., Dushay, M. S. and Theopold, U.** (2007). Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci* **120**, 1209-1215.
- Bigas, A. and Espinosa, L.** (2012). Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood* **119**, 3226-3235.
- Biggs, J. R., Peterson, L. F., Zhang, Y., Kraft, A. S. and Zhang, D. E.** (2006). AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* **26**, 7420-7429.
- Bilen, J. and Bonini, N. M.** (2007). Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet* **3**, 1950-1964.
- Binggeli, O., Neyen, C., Poidevin, M. and Lemaitre, B.** (2014). Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *PLoS Pathog* **10**, e1004067.
- Birch-Machin, I., Gao, S., Huen, D., McGirr, R., White, R. A. and Russell, S.** (2005). Genomic analysis of heat-shock factor targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **6**, R63.



- Blard, O., Feuillette, S., Bou, J., Chaumette, B., Frébourg, T., Campion, D. and Lecourtois, M.** (2007). Cytoskeleton proteins are modulators of mutant tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **16**, 555-566.
- Blyth, K., Cameron, E. R. and Neil, J. C.** (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 376-387.
- Borrell-Pagès, M., Canals, J. M., Cordelières, F. P., Parker, J. A., Pineda, J. R., Grange, G., Bryson, E. A., Guillermier, M., Hirsch, E., Hantraye, P., et al.** (2006). Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSJ1b and transglutaminase. *J Clin Invest* **116**, 1410-1424.
- Bras, S., Martin-Lannerée, S., Gobert, V., Augé, B., Breig, O., Sanial, M., Yamaguchi, M., Haenlin, M., Plessis, A. and Waltzer, L.** (2012). Myeloid leukemia factor is a conserved regulator of RUNX transcription factor activity involved in hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4986-4991.
- Breig, O., Bras, S., Martinez Soria, N., Osman, D., Heidenreich, O., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2014). Pontin is a critical regulator for AML1-ETO-induced leukemia. *Leukemia* **28**, 1271-1279.
- Bretscher, A. J., Honti, V., Binggeli, O., Burri, O., Poidevin, M., Kurucz, É., Zsámboki, J., Andó, I. and Lemaitre, B.** (2015). The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biol Open* **4**, 355-363.
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., et al.** (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* **20**, 1315-1320.
- Brückner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C. M., Rørth, P. and Perrimon, N.** (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev Cell* **7**, 73-84.
- Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H. and Skaer, H.** (2010). Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* **19**, 296-306.
- Burns, C. E., Traver, D., Mayhall, E., Shepard, J. L. and Zon, L. I.** (2005). Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev* **19**, 2331-2342.
- Cai, Z., de Bruijn, M., Ma, X., Dortland, B., Luteijn, T., Downing, R. J. and Dzierzak, E.** (2000). Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* **13**, 423-431.
- Cameron, E. R., Blyth, K., Hanlon, L., Kilbey, A., Mackay, N., Stewart, M., Terry, A., Vaillant, F., Wotton, S. and Neil, J. C.** (2003). The Runx genes as dominant oncogenes. *Blood Cells Mol Dis* **30**, 194-200.
- Canon, J. and Banerjee, U.** (2000). Runt and Lozenge function in *Drosophila* development. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 327-336.
- Carmel, J., Rashkovetsky, E., Nevo, E. and Korol, A.** (2011). Differential expression of small heat shock protein genes Hsp23 and Hsp40, and heat shock gene Hsr-omega in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) along a microclimatic gradient. *J Hered* **102**, 593-603.
- Ceredig, R., Rolink, A. G. and Brown, G.** (2009). Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* **9**, 293-300.
- Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Bonini, N. M. and Paulson, H. L.** (1999). Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci* **19**, 10338-10347.



- Chan, H. Y., Warrick, J. M., Gray-Board, G. L., Paulson, H. L. and Bonini, N. M.** (2000). Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **9**, 2811-2820.
- Cheetham, M. E. and Caplan, A. J.** (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* **3**, 28-36.
- Chen, H. K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S. F., Lam, Y. C., Kaytor, M. D., Fernandez, M. H., Aitken, A., Skoulakis, E. M., Orr, H. T., Botas, J., et al.** (2003). Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* **113**, 457-468.
- Chen, J., Guo, L., Peiffer, D. A., Zhou, L., Chan, O. T., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Lu, S. H., Zhan, Q., Wang-Rodriguez, J., et al.** (2008). Genomic profiling of 766 cancer-related genes in archived esophageal normal and carcinoma tissues. *Int J Cancer* **122**, 2249-2254.
- Chen, M. J., Yokomizo, T., Zeigler, B. M., Dzierzak, E. and Speck, N. A.** (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* **457**, 887-891.
- Ciocca, D. R. and Calderwood, S. K.** (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* **10**, 86-103.
- Clark, R. I., Woodcock, K. J., Geissmann, F., Trouillet, C. and Dionne, M. S.** (2011). Multiple TGF- $\beta$  superfamily signals modulate the adult *Drosophila* immune response. *Curr Biol* **21**, 1672-1677.
- Cohen, M. M.** (2013). Biology of RUNX2 and Cleidocranial Dysplasia. *J Craniofac Surg* **24**, 130-133.
- Colinet, H., Lee, S. F. and Hoffmann, A.** (2010). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* **277**, 174-185.
- Colinet, H., Siaussat, D., Bozzolan, F. and Bowler, K.** (2013). Rapid decline of cold tolerance at young age is associated with expression of stress genes in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **216**, 253-259.
- Collins, A., Littman, D. R. and Taniuchi, I.** (2009). RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol* **9**, 106-115.
- Colombo, E., Alcalay, M. and Pelicci, P. G.** (2011). Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene* **30**, 2595-2609.
- Cordero, J. B., Macagno, J. P., Stefanatos, R. K., Strathdee, K. E., Cagan, R. L. and Vidal, M.** (2010). Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev Cell* **18**, 999-1011.
- Corsi, A. K. and Schekman, R.** (1997). The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **137**, 1483-1493.
- Craven, S. E., French, D., Ye, W., de Sauvage, F. and Rosenthal, A.** (2005). Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* **105**, 3528-3534.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M.** (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol* **2**, E196.
- Crozatier, M. and Vincent, A.** (2011). *Drosophila*: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. *Dis Model Mech* **4**, 439-445.

- Cunnea, P. M., Miranda-Vizuete, A., Bertoli, G., Simmen, T., Damdimopoulos, A. E., Hermann, S., Leinonen, S., Huikko, M. P., Gustafsson, J. A., Sitia, R., et al.** (2003). ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J Biol Chem* **278**, 1059-1066.
- Daga, A., Karlovich, C. A., Dumstrei, K. and Banerjee, U.** (1996). Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1. *Genes Dev* **10**, 1194-1205.
- Dave, B., Granados-Principal, S., Zhu, R., Benz, S., Rabizadeh, S., Soon-Shiong, P., Yu, K. D., Shao, Z., Li, X., Gilcrease, M., et al.** (2014). Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8838-8843.
- Davidson, C. J., Tirouvanziam, R., Herzenberg, L. A. and Lipsick, J. S.** (2005). Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements *Drosophila* Myb in hemocytes. *Genetics* **169**, 215-229.
- De Braekeleer, E., Férec, C. and De Braekeleer, M.** (2009). RUNX1 translocations in malignant hemopathies. *Anticancer Res* **29**, 1031-1037.
- De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Testa, U. and Peschle, C.** (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489-493.
- Dearolf, C. R.** (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta* **1377**, M13-23.
- Deshpande, A. J. and Buske, C.** (2007). Knocking the Wnt out of the sails of leukemia stem cell development. *Cell Stem Cell* **1**, 597-598.
- Dhennin-Duthille, I., Nyga, R., Yahiaoui, S., Gouilleux-Gruart, V., Régnier, A., Lassoued, K. and Gouilleux, F.** (2011). The tumor suppressor hTid1 inhibits STAT5b activity via functional interaction. *J Biol Chem* **286**, 5034-5042.
- Dou, F., Netzer, W. J., Tanemura, K., Li, F., Hartl, F. U., Takashima, A., Gouras, G. K., Greengard, P. and Xu, H.** (2003). Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 721-726.
- Dragojlovic-Munther, M. and Martinez-Agosto, J. A.** (2012). Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of *Drosophila* blood progenitors. *Development* **139**, 3752-3763.
- (2013). Extracellular matrix-modulated Heartless signaling in *Drosophila* blood progenitors regulates their differentiation via a Ras/ETS/FOG pathway and target of rapamycin function. *Dev Biol* **384**, 313-330.
- Duffy, J. B. and Gergen, J. P.** (1991). The *Drosophila* segmentation gene runt acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene Sex-lethal. *Genes Dev* **5**, 2176-2187.
- Duffy, J. B., Kania, M. A. and Gergen, J. P.** (1991). Expression and function of the *Drosophila* gene runt in early stages of neural development. *Development* **113**, 1223-1230.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M. and Royet, J.** (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr Biol* **12**, 1923-1927.
- Eaves, C. J.** (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* **125**, 2605-2613.
- Eilken, H. M., Nishikawa, S. and Schroeder, T.** (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* **457**, 896-900.

- Elagib, K. E. and Goldfarb, A. N.** (2007). Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation. *Cancer Lett* **251**, 179-186.
- Elagib, K. E., Racke, F. K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L. L. and Goldfarb, A. N.** (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**, 4333-4341.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S. and Schneider, D.** (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 781-784.
- Erickson, P., Gao, J., Chang, K. S., Look, T., Whisenant, E., Raimondi, S., Lasher, R., Trujillo, J., Rowley, J. and Drabkin, H.** (1992). Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to *Drosophila* segmentation gene, runt. *Blood* **80**, 1825-1831.
- Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* **5**, 673-690.
- Falini, B., Bigerna, B., Pucciarini, A., Tiacchi, E., Mecucci, C., Morris, S. W., Bolli, N., Rosati, R., Hanissian, S., Ma, Z., et al.** (2006). Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukaemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia* **20**, 368-371.
- Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M. P., Liso, A., Gorello, P., Mandelli, F., Mecucci, C. and Martelli, M. F.** (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* **92**, 519-532.
- Fauvarque, M. O. and Williams, M. J.** (2011). *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J Cell Sci* **124**, 1373-1382.
- Fayazi, Z., Ghosh, S., Marion, S., Bao, X., Shero, M. and Kazemi-Esfarjani, P.** (2006). A *Drosophila* ortholog of the human MRJ modulates polyglutamine toxicity and aggregation. *Neurobiol Dis* **24**, 226-244.
- Ferguson, G. B. and Martinez-Agosto, J. A.** (2014a). Kicking it up a Notch for the best in show: Scalloped leads Yorkie into the haematopoietic arena. *Fly (Austin)* **8**, 206-217.
- (2014b). Yorkie and Scalloped signaling regulates Notch-dependent lineage specification during *Drosophila* hematopoiesis. *Curr Biol* **24**, 2665-2672.
- Ferjoux, G., Augé, B., Boyer, K., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2007). A GATA/RUNX cis-regulatory module couples *Drosophila* blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Dev Biol* **305**, 726-734.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P. J., et al.** (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* **408**, 101-106.
- Fink, A. L.** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* **79**, 425-449.
- Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., et al.** (2005). Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res* **15**, 376-384.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S. H. and Schulz, R. A.** (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11451-11456.
- Fouix, S., Martin-Lannerée, S., Sanial, M., Morla, L., Lamour-Isnard, C. and Plessis, A.** (2003). Over-expression of a novel nuclear interactor of Suppressor of fused, the *Drosophila* myelodysplasia/myeloid leukaemia factor, induces abnormal

- morphogenesis associated with increased apoptosis and DNA synthesis. *Genes Cells* **8**, 897-911.
- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J. and Ezekowitz, R. A.** (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-443.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. and White, K.** (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**, 1991-1994.
- Frisan, E., Vandekerckhove, J., de Thonel, A., Pierre-Eugène, C., Sternberg, A., Arlet, J. B., Floquet, C., Gyan, E., Kosmider, O., Dreyfus, F., et al.** (2012). Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 1532-1542.
- Gajewski, K. M., Sorrentino, R. P., Lee, J. H., Zhang, Q., Russell, M. and Schulz, R. A.** (2007). Identification of a crystal cell-specific enhancer of the black cells prophenoloxidase gene in *Drosophila*. *Genesis* **45**, 200-207.
- Gardini, A., Cesaroni, M., Luzi, L., Okumura, A. J., Biggs, J. R., Minardi, S. P., Venturini, E., Zhang, D. E., Pelicci, P. G. and Alcalay, M.** (2008). AML1/ETO oncoprotein is directed to AML1 binding regions and co-localizes with AML1 and HEB on its targets. *PLoS Genet* **4**, e1000275.
- Gergen, J. P. and Butler, B. A.** (1988). Isolation of the *Drosophila* segmentation gene runt and analysis of its expression during embryogenesis. *Genes Dev* **2**, 1179-1193.
- Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S. and Mandal, L.** (2015). Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev Cell* **33**, 478-488.
- Gibbs, S. J. and Braun, J. E.** (2008). Emerging roles of J proteins in neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis* **32**, 196-199.
- Gobert, V., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2012). Myeloid leukemia factor: a return ticket from human leukemia to fly hematopoiesis. *Transcription* **3**, 250-254.
- Gobert, V., Osman, D., Bras, S., Augé, B., Boube, M., Bourbon, H. M., Horn, T., Boutros, M., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2010). A genome-wide RNA interference screen identifies a differential role of the mediator CDK8 module subunits for GATA/ RUNX-activated transcription in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* **30**, 2837-2848.
- Gonsalves, S. E., Moses, A. M., Razak, Z., Robert, F. and Westwood, J. T.** (2011). Whole-genome analysis reveals that active heat shock factor binding sites are mostly associated with non-heat shock genes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **6**, e15934.
- Goto, A., Kumagai, T., Kumagai, C., Hirose, J., Narita, H., Mori, H., Kadowaki, T., Beck, K. and Kitagawa, Y.** (2001). A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. *Biochem J* **359**, 99-108.
- Grigorian, M., Liu, T., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2013). The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol* **384**, 301-312.
- Growney, J. D., Shigematsu, H., Li, Z., Lee, B. H., Adelsperger, J., Rowan, R., Curley, D. P., Kutok, J. L., Akashi, K., Williams, I. R., et al.** (2005). Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* **106**, 494-504.
- Gueguen, G., Kalamarz, M. E., Ramroop, J., Uribe, J. and Govind, S.** (2013). Polydn viral ankyrin proteins aid parasitic wasp survival by coordinate and selective inhibition of hematopoietic and immune NF-kappa B signaling in insect hosts. *PLoS Pathog* **9**, e1003580.



- Guo, Y., Maillard, I., Chakraborti, S., Rothenberg, E. V. and Speck, N. A.** (2008). Core binding factors are necessary for natural killer cell development and cooperate with Notch signaling during T-cell specification. *Blood* **112**, 480-492.
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., Poellinger, L., Lendahl, U. and Bondesson, M.** (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9**, 617-628.
- Hageman, J., Rujano, M. A., van Waarde, M. A., Kakkar, V., Dirks, R. P., Govorukhina, N., Oosterveld-Hut, H. M., Lubsen, N. H. and Kampinga, H. H.** (2010). A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation. *Mol Cell* **37**, 355-369.
- Hamelin, V., Letourneux, C., Romeo, P. H., Porteu, F. and Gaudry, M.** (2006). Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood* **107**, 3106-3113.
- Harada, Y. and Harada, H.** (2009). Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* **220**, 16-20.
- Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M. and Perrimon, N.** (1995). Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* **14**, 2857-2865.
- Hartenstein, V.** (2006). Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 677-712.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R.** (2003). The two origins of hemocytes in Drosophila. *Development* **130**, 4955-4962.
- Hong, Y. H., Kim, E. S. and Lillehoj, H. S.** (2011). Identification of parental line specific effects of MLF2 on resistance to coccidiosis in chickens. *BMC Proc* **5 Suppl 4**, S21.
- Honti, V., Csordás, G., Kurucz, É., Márkus, R. and Andó, I.** (2014). The cell-mediated immunity of Drosophila melanogaster: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol* **42**, 47-56.
- Honti, V., Csordás, G., Márkus, R., Kurucz, E., Jankovics, F. and Andó, I.** (2010). Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in Drosophila melanogaster. *Mol Immunol* **47**, 1997-2004.
- Hosoda, A., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K.** (2003). JPDI, a novel endoplasmic reticulum-resident protein containing both a BiP-interacting J-domain and thioredoxin-like motifs. *J Biol Chem* **278**, 2669-2676.
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X. and Perrimon, N.** (2002). The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev Cell* **3**, 765-778.
- Housden, B. E., Millen, K. and Bray, S. J.** (2012). Drosophila Reporter Vectors Compatible with ΦC31 Integrase Transgenesis Techniques and Their Use to Generate New Notch Reporter Fly Lines. *G3 (Bethesda)* **2**, 79-82.
- Huang, C., Cheng, H., Hao, S., Zhou, H., Zhang, X., Gao, J., Sun, Q. H., Hu, H. and Wang, C. C.** (2006). Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via interactions with diverse intermediates. *J Mol Biol* **364**, 323-336.
- Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H. J., Yokomizo, T. and Ito, Y.** (2001). Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J* **20**, 723-733.
- Huang, H., Woo, A. J., Waldon, Z., Schindler, Y., Moran, T. B., Zhu, H. H., Feng, G. S., Steen, H. and Cantor, A. B.** (2012). A Src family kinase-Shp2 axis controls RUNX1 activity in megakaryocyte and T-lymphocyte differentiation. *Genes Dev* **26**, 1587-1601.

- Hudry, B., Viala, S., Graba, Y. and Merabet, S.** (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biol* **9**, 5.
- Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., et al.** (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* **10**, 299-304.
- Imai, Y., Kurokawa, M., Yamaguchi, Y., Izutsu, K., Nitta, E., Mitani, K., Satake, M., Noda, T., Ito, Y. and Hirai, H.** (2004). The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* **24**, 1033-1043.
- Inoue, K., Shiga, T. and Ito, Y.** (2008). Runx transcription factors in neuronal development. *Neural Dev* **3**, 20.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J. A., Hetru, C. and Meister, M.** (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* **7**, 335-350.
- Ito, Y., Bae, S. C. and Chuang, L. S.** (2015). The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 81-95.
- Iwasaki, H. and Akashi, K.** (2007). Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* **26**, 6687-6696.
- Jamrich, M., Greenleaf, A. L. and Bautz, E. K.** (1977). Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2079-2083.
- Jauregui, M. P., Sanchez, S. R., Ewton, A. A., Rice, L., Perkins, S. L., Dunphy, C. H. and Chang, C. C.** (2008). The role of beta-catenin in chronic myeloproliferative disorders. *Hum Pathol* **39**, 1454-1458.
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. and Garrido, C.** (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* **332**, 275-285.
- Jermy, A. J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B. M. and Stirling, C. J.** (2006). The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J Biol Chem* **281**, 7899-7906.
- Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C. and Banerjee, U.** (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132**, 2521-2533.
- Kawamoto, H., Wada, H. and Katsura, Y.** (2010). A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol* **22**, 65-70.
- Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S.** (2000). Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* **287**, 1837-1840.
- (2002). Suppression of polyglutamine toxicity by a *Drosophila* homolog of myeloid leukemia factor 1. *Hum Mol Genet* **11**, 2657-2672.
- Kelley, W. L.** (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* **23**, 222-227.
- Kelly, L. M. and Gilliland, D. G.** (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**, 179-198.
- Kelsey, E. M., Luo, X., Brückner, K. and Jasper, H.** (2012). Schnurri regulates hemocyte function to promote tissue recovery after DNA damage. *J Cell Sci* **125**, 1393-1400.
- Kemp, C. and Imler, J. L.** (2009). Antiviral immunity in *drosophila*. *Curr Opin Immunol* **21**, 3-9.
- Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R. and Höhfeld, J.** (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem* **391**, 481-489.

- Khadilkar, R. J., Rodrigues, D., Mote, R. D., Sinha, A. R., Kulkarni, V., Magadi, S. S. and Inamdar, M. S.** (2014). ARF1-GTP regulates Asrij to provide endocytic control of Drosophila blood cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 4898-4903.
- Kim, E. S., Hong, Y. H. and Lillehoj, H. S.** (2010). Genetic effects analysis of myeloid leukemia factor 2 and T cell receptor-beta on resistance to coccidiosis in chickens. *Poult Sci* **89**, 20-27.
- Kim, J. H., Jang, J. W., Lee, Y. S., Lee, J. W., Chi, X. Z., Li, Y. H., Kim, M. K., Kim, D. M., Choi, B. S., Kim, J., et al.** (2014). RUNX family members are covalently modified and regulated by PIAS1-mediated sumoylation. *Oncogenesis* **3**, e101.
- Kim, W. Y., Fayazi, Z., Bao, X., Higgins, D. and Kazemi-Esfarjani, P.** (2005). Evidence for sequestration of polyglutamine inclusions by Drosophila myeloid leukemia factor. *Mol Cell Neurosci* **29**, 536-544.
- Kitabayashi, I., Aikawa, Y., Nguyen, L. A., Yokoyama, A. and Ohki, M.** (2001). Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *EMBO J* **20**, 7184-7196.
- Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Yaguchi, H., Kitabayashi, I., Tsukada, T., Nomura, T., Miyachi, Y., et al.** (2009). Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity* **31**, 609-620.
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M., et al.** (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila. *Cell* **123**, 335-346.
- Komori, T.** (2010a). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* **339**, 189-195.
- (2010b). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol* **658**, 43-49.
- Kondo, M., Scherer, D. C., King, A. G., Manz, M. G. and Weissman, I. L.** (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 520-526.
- Kounatidis, I. and Ligoxygakis, P.** (2012). Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol* **2**, 120075.
- Koutras, C. and Braun, J. E.** (2014). J protein mutations and resulting proteostasis collapse. *Front Cell Neurosci* **8**, 191.
- Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M. and Vincent, A.** (2010). Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the Drosophila lymph gland. *Dev Biol* **346**, 310-319.
- Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A. and Crozatier, M.** (2007). Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre. *Nature* **446**, 325-328.
- Kulkarni, V., Khadilkar, R. J., Magadi, S. S., Srivathsa, M. S. and Inamdar, M. S.** (2011). Asrij maintains the stem cell niche and controls differentiation during Drosophila lymph gland hematopoiesis. *PLoS One* **6**, e27667.
- Kurata, M., Hirata, M., Watabe, S., Miyake, M., Takahashi, S. Y. and Yamamoto, Y.** (2003). Expression, purification, and inhibitory activities of mouse cytotoxic T-lymphocyte antigen-2alpha. *Protein Expr Purif* **32**, 119-125.
- Kurucz, E., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., et al.** (2007a). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in Drosophila plasmatocytes. *Curr Biol* **17**, 649-654.



- Kurucz, E., Váci, B., Márkus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsámboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D. and Andó, I.** (2007b). Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol Hung* **58 Suppl**, 95-111.
- Kurucz, E., Zettervall, C. J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedüs, Z., Ando, I. and Hultmark, D.** (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2622-2627.
- Lam, K. and Zhang, D. E.** (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 1120-1139.
- Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V. and Lacaud, G.** (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* **457**, 892-895.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M.** (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **230**, 243-257.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-149.
- Lebestky, T., Jung, S. H. and Banerjee, U.** (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev* **17**, 348-353.
- Lee, W. H., Salek-Ardakani, S., Pandolfi, P. P., Brady, H. J., de Boer, J. and Williams, O.** (2012). NPM-MLF1 synergizes with Npm haploinsufficiency to enhance myeloid progenitor activity. *Leukemia* **26**, 1110-1112.
- Leitão, A. B. and Sucena, É.** (2015). *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *Elife* **4**.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J.** (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**, 697-743.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A.** (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14614-14619.
- Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B., et al.** (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* **109**, 113-124.
- Li, X., Ma, M., Liu, F., Chen, Y., Lu, A., Ling, Q. Z., Li, J., Beerntsen, B. T., Yu, X. Q., Liu, C., et al.** (2012). Properties of *Drosophila melanogaster* prophenoloxidases expressed in *Escherichia coli*. *Dev Comp Immunol* **36**, 648-656.
- Liew, E. and Owen, C.** (2011). Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica* **96**, 1536-1542.
- Lim, G., Choi, J. R., Kim, M. J., Kim, S. Y., Lee, H. J., Suh, J. T., Yoon, H. J., Lee, J., Lee, S., Lee, W. I., et al.** (2010). Detection of t(3;5) and NPM1/MLF1 rearrangement in an elderly patient with acute myeloid leukemia: clinical and laboratory study with review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* **199**, 101-109.
- Lim, R., Winteringham, L. N., Williams, J. H., McCulloch, R. K., Ingley, E., Tiao, J. Y., Lalonde, J. P., Tsai, S., Tilbrook, P. A., Sun, Y., et al.** (2002). MADM, a novel adaptor protein that mediates phosphorylation of the 14-3-3 binding site of myeloid leukemia factor 1. *J Biol Chem* **277**, 40997-41008.
- Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* **55**, 1151-1191.
- Lotem, J., Levanon, D., Negreanu, V., Bauer, O., Hantisteanu, S., Dicken, J. and Groner, Y.** (2015). Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1855**, 131-143.

- Lou, S., Duan, B., Vong, L., Lowell, B. B. and Ma, Q.** (2013). Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-mechanoreceptors. *J Neurosci* **33**, 870-882.
- Lu, B., Garrido, N., Spelbrink, J. N. and Suzuki, C. K.** (2006). Tid1 isoforms are mitochondrial DnaJ-like chaperones with unique carboxyl termini that determine cytosolic fate. *J Biol Chem* **281**, 13150-13158.
- Lui, J. C. and Kong, S. K.** (2007). Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett* **581**, 109-117.
- Luo, H., Hanratty, W. P. and Dearolf, C. R.** (1995). An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J* **14**, 1412-1420.
- Lutterbach, B. and Hiebert, S. W.** (2000). Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* **245**, 223-235.
- Mackenzie, D. K., Bussière, L. F. and Tinsley, M. C.** (2011). Senescence of the cellular immune response in Drosophila melanogaster. *Exp Gerontol* **46**, 853-859.
- Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E. and Brückner, K.** (2011). The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the Drosophila larva. *Development* **138**, 5379-5391.
- Makki, R., Meister, M., Penetier, D., Ubeda, J. M., Braun, A., Daburon, V., Krzemień, J., Bourbon, H. M., Zhou, R., Vincent, A., et al.** (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the Drosophila cellular immune response. *PLoS Biol* **8**, e1000441.
- Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P. and Nakanishi, Y.** (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* **279**, 48466-48476.
- Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* **36**, 1019-1023.
- Mandal, L., Martinez-Agosto, J. A., Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors. *Nature* **446**, 320-324.
- Mansur, M. B., van Delft, F. W., Colman, S. M., Furness, C. L., Gibson, J., Emerenciano, M., Kempinski, H., Clappier, E., Cave, H., Soulier, J., et al.** (2015). Distinctive genotypes in infants with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*.
- Marchler, G. and Wu, C.** (2001). Modulation of Drosophila heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1. *EMBO J* **20**, 499-509.
- Martin-Lannerée, S., Lasbleiz, C., Sanial, M., Fouix, S., Besse, F., Tricoire, H. and Plessis, A.** (2006). Characterization of the Drosophila myeloid leukemia factor. *Genes Cells* **11**, 1317-1335.
- Martinez, N., Drescher, B., Riehle, H., Cullmann, C., Vornlocher, H. P., Ganser, A., Heil, G., Nordheim, A., Krauter, J. and Heidenreich, O.** (2004). The oncogenic fusion protein RUNX1-CBFA2T1 supports proliferation and inhibits senescence in t(8;21)-positive leukaemic cells. *BMC Cancer* **4**, 44.
- Martinez-Agosto, J. A., Mikkola, H. K., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2007). The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* **21**, 3044-3060.

- Matova, N. and Anderson, K. V.** (2006). Rel/NF-kappaB double mutants reveal that cellular immunity is central to Drosophila host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16424-16429.
- Matsukage, A., Hirose, F., Yoo, M. A. and Yamaguchi, M.** (2008). The DRE/DREF transcriptional regulatory system: a master key for cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 81-89.
- Matsumoto, N., Yoneda-Kato, N., Iguchi, T., Kishimoto, Y., Kyo, T., Sawada, H., Tatsumi, E. and Fukuhara, S.** (2000). Elevated MLF1 expression correlates with malignant progression from myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **14**, 1757-1765.
- Matsuura, S., Yan, M., Lo, M. C., Ahn, E. Y., Weng, S., Dangoor, D., Matin, M., Higashi, T., Feng, G. S. and Zhang, D. E.** (2012). Negative effects of GM-CSF signaling in a murine model of t(8;21)-induced leukemia. *Blood* **119**, 3155-3163.
- Medvinsky, A., Rybtsov, S. and Taoudi, S.** (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* **138**, 1017-1031.
- Meister, M.** (2004). Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* **16**, 10-15.
- Michaud, J., Wu, F., Osato, M., Cottles, G. M., Yanagida, M., Asou, N., Shigesada, K., Ito, Y., Benson, K. F., Raskind, W. H., et al.** (2002). In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood* **99**, 1364-1372.
- Milton, C. C., Grusche, F. A., Degoutin, J. L., Yu, E., Dai, Q., Lai, E. C. and Harvey, K. F.** (2014). The Hippo pathway regulates hematopoiesis in Drosophila melanogaster. *Curr Biol* **24**, 2673-2680.
- Minakhina, S. and Steward, R.** (2010). Hematopoietic stem cells in Drosophila. *Development* **137**, 27-31.
- Minakhina, S., Tan, W. and Steward, R.** (2011). JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in Drosophila. *Dev Biol* **352**, 308-316.
- Miyoshi, H., Ohira, M., Shimizu, K., Mitani, K., Hirai, H., Imai, T., Yokoyama, K., Soeda, E. and Ohki, M.** (1995). Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* **23**, 2762-2769.
- Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y. and Ohki, M.** (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10431-10434.
- Molzan, M. and Ottmann, C.** (2013). Subcellular localization of full-length human myeloid leukemia factor 1 (MLF1) is independent of 14-3-3 proteins. *Cell Mol Biol Lett* **18**, 137-148.
- Mondal, B. C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C. J., Sinenko, S. A., Martinez-Agosto, J. A. and Banerjee, U.** (2011). Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* **147**, 1589-1600.
- Moreira, A. P., Dias-Melicio, L. A. and Soares, A. M.** (2010). Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages Paracoccidioides brasiliensis killing: effect on H2O2 and NO production. *Cell Immunol* **263**, 196-203.
- Muchowski, P. J. and Wacker, J. L.** (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* **6**, 11-22.
- Mukherjee, T., Kim, W. S., Mandal, L. and Banerjee, U.** (2011). Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of Drosophila blood cells. *Science* **332**, 1210-1213.

- Muratoglu, S., Hough, B., Mon, S. T. and Fossett, N.** (2007). The GATA factor Serpent cross-regulates lozenge and u-shaped expression during *Drosophila* blood cell development. *Dev Biol* **311**, 636-649.
- Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D. and Andó, I.** (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4805-4809.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. and Fessler, J. H.** (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J* **13**, 3438-3447.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S. and Dyda, F.** (2001). Crystal structure of the 14-3-3 $\zeta$ :serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**, 257-267.
- Ohno, K., Takahashi, Y., Hirose, F., Inoue, Y. H., Taguchi, O., Nishida, Y., Matsukage, A. and Yamaguchi, M.** (2000). Characterization of a *Drosophila* homologue of the human myelodysplasia/myeloid leukemia factor (MLF). *Gene* **260**, 133-143.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. and Downing, J. R.** (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321-330.
- Okumura, A. J., Peterson, L. F., Okumura, F., Boyapati, A. and Zhang, D. E.** (2008). t(8;21)(q22;q22) Fusion proteins preferentially bind to duplicated AML1/RUNX1 DNA-binding sequences to differentially regulate gene expression. *Blood* **112**, 1392-1401.
- Oliva, C., Molina-Fernandez, C., Maureira, M., Candia, N., López, E., Hassan, B., Aerts, S., Cánovas, J., Olguín, P. and Sierralta, J.** (2015). Hindsight regulates photoreceptor axon targeting through transcriptional control of jitterbug/Filamin and multiple genes involved in axon guidance in *Drosophila*. *Dev Neurobiol* **75**, 1018-1032.
- Olofsson, B. and Page, D. T.** (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**, 233-243.
- Orkin, S. H.** (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**, 57-64.
- Orkin, S. H., Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y. and McDevitt, M. A.** (1998). Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells* **16 Suppl 2**, 79-83.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I.** (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644.
- Osman, D., Gobert, V., Ponthan, F., Heidenreich, O., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2009). A *Drosophila* model identifies calpains as modulators of the human leukemogenic fusion protein AML1-ETO. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12043-12048.
- Osorio, K. M., Lee, S. E., McDermitt, D. J., Waghmare, S. K., Zhang, Y. V., Woo, H. N. and Tumber, T.** (2008). Runx1 modulates developmental, but not injury-driven, hair follicle stem cell activation. *Development* **135**, 1059-1068.
- Osorio, K. M., Lilja, K. C. and Tumber, T.** (2011). Runx1 modulates adult hair follicle stem cell emergence and maintenance from distinct embryonic skin compartments. *J Cell Biol* **193**, 235-250.
- Paladi, M. and Tepass, U.** (2004). Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in *Drosophila*. *J Cell Sci* **117**, 6313-6326.



- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. and Xu, T.** (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech* **1**, 144-154; discussion 153.
- Peeples, E. E., Geisler, A., Whitcraft, C. J. and Oliver, C. P.** (1969a). Activity of phenol oxidases at the puparium formation stage in development of nineteen lozenge mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet* **3**, 563-569.
- (1969b). Comparative studies of phenol oxidase activity during pupal development of three lozenge mutants (lz8,lz,lzk) of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **62**, 161-170.
- Pelletier, N., Champagne, N., Stifani, S. and Yang, X. J.** (2002). MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2. *Oncogene* **21**, 2729-2740.
- Pencovich, N., Jaschek, R., Tanay, A. and Groner, Y.** (2011). Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. *Blood* **117**, e1-14.
- Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A. and Crozatier, M.** (2012). Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3389-3394.
- Peterson, L. F., Boyapati, A., Ahn, E. Y., Biggs, J. R., Okumura, A. J., Lo, M. C., Yan, M. and Zhang, D. E.** (2007). Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood* **110**, 799-805.
- Petrovick, M. S., Hiebert, S. W., Friedman, A. D., Hetherington, C. J., Tenen, D. G. and Zhang, D. E.** (1998). Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* **18**, 3915-3925.
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. and Schneider, D. S.** (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog* **3**, e26.
- Ptasinska, A., Assi, S. A., Mannari, D., James, S. R., Williamson, D., Dunne, J., Hoogenkamp, M., Wu, M., Care, M., McNeill, H., et al.** (2012). Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia* **26**, 1829-1841.
- Qian, Y. Q., Patel, D., Hartl, F. U. and McColl, D. J.** (1996). Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J Mol Biol* **260**, 224-235.
- Qiu, P., Pan, P. C. and Govind, S.** (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* **125**, 1909-1920.
- Querfurth, E., Schuster, M., Kulesa, H., Crispino, J. D., Döderlein, G., Orkin, S. H., Graf, T. and Nerlov, C.** (2000). Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* **14**, 2515-2525.
- Real, P. J., Navarro-Montero, O., Ramos-Mejía, V., Ayllón, V., Bueno, C. and Menéndez, P.** (2013). The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells. *Blood* **121**, 5250-5252.
- Reed-Inderbitzin, E., Moreno-Miralles, I., Vanden-Eynden, S. K., Xie, J., Lutterbach, B., Durst-Goodwin, K. L., Luce, K. S., Irvin, B. J., Cleary, M. L., Brandt, S. J., et al.** (2006). RUNX1 associates with histone deacetylases and SUV39H1 to repress transcription. *Oncogene* **25**, 5777-5786.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M. and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-4031.

- Rennert, J., Coffman, J. A., Mushegian, A. R. and Robertson, A. J.** (2003). The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. *BMC Evol Biol* **3**, 4.
- Reya, T. and Clevers, H.** (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843-850.
- Ribeil, J. A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I. C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sørensen, T., et al.** (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102-105.
- Rizki, T. M. and Rizki, R. M.** (1981). Genetics of tumor-W in *Drosophila melanogaster*: mapping a gene with incomplete penetrance. *J Hered* **72**, 78-80.
- Rizki, T. M., Rizki, R. M. and Bellotti, R. A.** (1985). Genetics of a *Drosophila* phenoloxidase. *Mol Gen Genet* **201**, 7-13.
- Robert-Moreno, A., Espinosa, L., de la Pompa, J. L. and Bigas, A.** (2005). RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development* **132**, 1117-1126.
- Robertson, A. J., Larroux, C., Degnan, B. M. and Coffman, J. A.** (2009). The evolution of Runx genes II. The C-terminal Groucho recruitment motif is present in both eumetazoans and homoscleromorphs but absent in a haplosclerid demosponge. *BMC Res Notes* **2**, 59.
- Saibil, H.** (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 630-642.
- Sardina, J. L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B., Llanillo, M. and Hernández-Hernández, A.** (2012). Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit Rev Oncol Hematol* **81**, 257-274.
- Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T. M., Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., et al.** (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* **115**, 2159-2168.
- Schofield, R.** (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.
- Sherman, M. Y. and Goldberg, A. L.** (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, 15-32.
- Shi, Y. Y., Tang, W., Hao, S. F. and Wang, C. C.** (2005). Contributions of cysteine residues in Zn2 to zinc fingers and thiol-disulfide oxidoreductase activities of chaperone DnaJ. *Biochemistry* **44**, 1683-1689.
- Shia, A. K., Glittenberg, M., Thompson, G., Weber, A. N., Reichhart, J. M. and Ligoxygakis, P.** (2009). Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes. *J Cell Sci* **122**, 4505-4515.
- Shim, J., Gururaja-Rao, S. and Banerjee, U.** (2013a). Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* **140**, 4647-4656.
- Shim, J., Mukherjee, T., Mondal, B. C., Liu, T., Young, G. C., Wijewarnasuriya, D. P. and Banerjee, U.** (2013b). Olfactory control of blood progenitor maintenance. *Cell* **155**, 1141-1153.
- Shimizu, R. and Yamamoto, M.** (2005). Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 129-136.
- Sinenko, S. A., Hung, T., Moroz, T., Tran, Q. M., Sidhu, S., Cheney, M. D., Speck, N. A. and Banerjee, U.** (2010). Genetic manipulation of AML1-ETO-induced expansion of hematopoietic precursors in a *Drosophila* model. *Blood* **116**, 4612-4620.

- Sinenko, S. A., Mandal, L., Martinez-Agosto, J. A. and Banerjee, U.** (2009). Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Dev Cell* **16**, 756-763.
- Sinenko, S. A., Shim, J. and Banerjee, U.** (2012). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep* **13**, 83-89.
- Small, C., Ramroop, J., Otazo, M., Huang, L. H., Saleque, S. and Govind, S.** (2014). An unexpected link between notch signaling and ROS in restricting the differentiation of hematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Genetics* **197**, 471-483.
- Smith, C.** (2003). Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* **10**, 9-16.
- Song, W. J., Sullivan, M. G., Legare, R. D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, D., Ratajczak, J., Resende, I. C., Haworth, C., Hock, R., et al.** (1999). Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* **23**, 166-175.
- Sterrenberg, J. N., Blatch, G. L. and Edkins, A. L.** (2011). Human DNAJ in cancer and stem cells. *Cancer Lett* **312**, 129-142.
- Stofanko, M., Kwon, S. Y. and Badenhorst, P.** (2010). Lineage tracing of lamellocytes demonstrates *Drosophila* macrophage plasticity. *PLoS One* **5**, e14051.
- Sugano, W., Ohno, K., Yoneda-Kato, N., Kato, J. Y. and Yamaguchi, M.** (2008). The myeloid leukemia factor interacts with COP9 signalosome subunit 3 in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* **275**, 588-600.
- Sun, W. and Downing, J. R.** (2004). Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* **104**, 3565-3572.
- Sun, W., Zhang, K., Zhang, X., Lei, W., Xiao, T., Ma, J., Guo, S., Shao, S., Zhang, H., Liu, Y., et al.** (2004). Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Cancer Lett* **212**, 83-93.
- Sykitotis, G. P. and Bohmann, D.** (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* **14**, 76-85.
- Szyperski, T., Pellicchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. and Wüthrich, K.** (1994). NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11343-11347.
- Takeuchi, T., Suzuki, M., Fujikake, N., Popiel, H. A., Kikuchi, H., Futaki, S., Wada, K. and Nagai, Y.** (2015). Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2497-2506.
- Tao, T., Shi, H., Guan, Y., Huang, D., Chen, Y., Lane, D. P., Chen, J. and Peng, J.** (2013). Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation. *Cell Res* **23**, 620-634.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-1837.
- Terriente-Felix, A., Li, J., Collins, S., Mulligan, A., Reekie, I., Bernard, F., Krejci, A. and Bray, S.** (2013). Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme. *Development* **140**, 926-937.
- Theopold, U., Krautz, R. and Dushay, M. S.** (2014). The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. *Dev Comp Immunol* **42**, 42-46.
- Thomas, D. and Kansara, M.** (2006). Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. *J Cell Biochem* **98**, 757-769.



- Tijssen, M. R., Cvejic, A., Joshi, A., Hannah, R. L., Ferreira, R., Forrai, A., Bellissimo, D. C., Oram, S. H., Smethurst, P. A., Wilson, N. K., et al.** (2011). Genome-wide analysis of simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL binding in megakaryocytes identifies hematopoietic regulators. *Dev Cell* **20**, 597-609.
- Tokusumi, T., Shoue, D. A., Tokusumi, Y., Stoller, J. R. and Schulz, R. A.** (2009). New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. *Genesis* **47**, 771-774.
- Tokusumi, Y., Tokusumi, T., Shoue, D. A. and Schulz, R. A.** (2012). Gene regulatory networks controlling hematopoietic progenitor niche cell production and differentiation in the *Drosophila* lymph gland. *PLoS One* **7**, e41604.
- Traver, D. and Zon, L. I.** (2002). Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* **108**, 731-734.
- Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B. and Orkin, S. H.** (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* **12**, 1176-1188.
- Tsuzuki, S. and Seto, M.** (2012). Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood* **119**, 727-735.
- Tzivion, G., Luo, Z. and Avruch, J.** (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**, 88-92.
- Uma, S., Hartson, S. D., Chen, J. J. and Matts, R. L.** (1997). Hsp90 is obligatory for the heme-regulated eIF-2 $\alpha$  kinase to acquire and maintain an activable conformation. *J Biol Chem* **272**, 11648-11656.
- Vainchenker, W. and Constantinescu, S. N.** (2013). JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* **32**, 2601-2613.
- van den Heuvel, D. M., Harschnitz, O., van den Berg, L. H. and Pasterkamp, R. J.** (2014). Taking a risk: a therapeutic focus on ataxin-2 in amyotrophic lateral sclerosis? *Trends Mol Med* **20**, 25-35.
- van Galen, P., Kreso, A., Mbong, N., Kent, D. G., Fitzmaurice, T., Chambers, J. E., Xie, S., Laurenti, E., Hermans, K., Eppert, K., et al.** (2014). The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* **510**, 268-272.
- Vass, E. and Nappi, A. J.** (2000). Developmental and immunological aspects of *Drosophila*-parasitoid relationships. *J Parasitol* **86**, 1259-1270.
- Villa, J. C., Chiu, D., Brandes, A. H., Escorcía, F. E., Villa, C. H., Maguire, W. F., Hu, C. J., de Stanchina, E., Simon, M. C., Sisodia, S. S., et al.** (2014). Nontranscriptional role of Hif-1 $\alpha$  in activation of  $\gamma$ -secretase and notch signaling in breast cancer. *Cell Rep* **8**, 1077-1092.
- Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S. and Kampinga, H. H.** (2008). Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* **47**, 7001-7011.
- Waltzer, L., Bataillé, L., Peyrefitte, S. and Haenlin, M.** (2002). Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *EMBO J* **21**, 5477-5486.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataillé, L. and Haenlin, M.** (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J* **22**, 6516-6525.
- Waltzer, L., Gobert, V., Osman, D. and Haenlin, M.** (2010). Transcription factor interplay during *Drosophila* haematopoiesis. *Int J Dev Biol* **54**, 1107-1115.
- Wang, H., Zou, J., Zhao, B., Johannsen, E., Ashworth, T., Wong, H., Pear, W. S., Schug, J., Blacklow, S. C., Arnett, K. L., et al.** (2011a). Genome-wide analysis reveals

- conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14908-14913.
- Wang, L., Huang, G., Zhao, X., Hatlen, M. A., Vu, L., Liu, F. and Nimer, S. D.** (2009). Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis* **43**, 30-34.
- Wang, L. and Ligoxygakis, P.** (2006). Pathogen recognition and signalling in the Drosophila innate immune response. *Immunobiology* **211**, 251-261.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H. and Speck, N. A.** (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3444-3449.
- Wang, S., Zhang, Y., Soosairajah, J. and Kraft, A. S.** (2007). Regulation of RUNX1/AML1 during the G2/M transition. *Leuk Res* **31**, 839-851.
- Wang, Y. Y., Zhao, L. J., Wu, C. F., Liu, P., Shi, L., Liang, Y., Xiong, S. M., Mi, J. Q., Chen, Z., Ren, R., et al.** (2011b). C-KIT mutation cooperates with full-length AML1-ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2450-2455.
- Weiss, M. J. and dos Santos, C. O.** (2009). Chaperoning erythropoiesis. *Blood* **113**, 2136-2144.
- Welman, A., Serrels, A., Brunton, V. G., Ditzel, M. and Frame, M. C.** (2010). Two-color photoactivatable probe for selective tracking of proteins and cells. *J Biol Chem* **285**, 11607-11616.
- Wildonger, J. and Mann, R. S.** (2005). The t(8;21) translocation converts AML1 into a constitutive transcriptional repressor. *Development* **132**, 2263-2272.
- Wildonger, J., Sosinsky, A., Honig, B. and Mann, R. S.** (2005). Lozenge directly activates argos and klumpfuss to regulate programmed cell death. *Genes Dev* **19**, 1034-1039.
- Williams, J. H., Daly, L. N., Ingley, E., Beaumont, J. G., Tilbrook, P. A., Lalonde, J. P., Stillitano, J. P. and Klinken, S. P.** (1999). HLS7, a hemopoietic lineage switch gene homologous to the leukemia-inducing gene MLF1. *EMBO J* **18**, 5559-5566.
- Wilson, N. K., Foster, S. D., Wang, X., Knezevic, K., Schütte, J., Kaimakis, P., Chilarska, P. M., Kinston, S., Ouwehand, W. H., Dzierzak, E., et al.** (2010). Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* **7**, 532-544.
- Wilson, N. K., Miranda-Saavedra, D., Kinston, S., Bonadies, N., Foster, S. D., Calero-Nieto, F., Dawson, M. A., Donaldson, I. J., Dumon, S., Frampton, J., et al.** (2009). The transcriptional program controlled by the stem cell leukemia gene Scf/Tal1 during early embryonic hematopoietic development. *Blood* **113**, 5456-5465.
- Winteringham, L. N., Endersby, R., Kobelke, S., McCulloch, R. K., Williams, J. H., Stillitano, J., Cornwall, S. M., Ingley, E. and Klinken, S. P.** (2006). Myeloid leukemia factor 1 associates with a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like molecule. *J Biol Chem* **281**, 38791-38800.
- Winteringham, L. N., Kobelke, S., Williams, J. H., Ingley, E. and Klinken, S. P.** (2004). Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* **23**, 5105-5109.
- Wood, W., Faria, C. and Jacinto, A.** (2006). Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in Drosophila melanogaster. *J Cell Biol* **173**, 405-416.
- Woolf, E., Xiao, C., Fainaru, O., Lotem, J., Rosen, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Brenner, O., Berke, G., et al.** (2003). Runx3 and Runx1 are

- required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7731-7736.
- Wu, C.** (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 441-469.
- Xu, J., Ren, X., Sun, J., Wang, X., Qiao, H. H., Xu, B. W., Liu, L. P. and Ni, J. Q.** (2015). A Toolkit of CRISPR-Based Genome Editing Systems in *Drosophila*. *J Genet Genomics* **42**, 141-149.
- Yanai, H., Yoshioka, Y., Yoshida, H., Nakao, Y., Plessis, A. and Yamaguchi, M.** (2014). *Drosophila* myeloid leukemia factor acts with DREF to activate the JNK signaling pathway. *Oncogenesis* **3**, e98.
- Yano, M., Nakamuta, S., Wu, X., Okumura, Y. and Kido, H.** (2006). A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3zeta is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins. *Mol Biol Cell* **17**, 4769-4779.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A. and Dearolf, C. R.** (1997). viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* **198**, 17-25.
- Yochem, J., Uchida, H., Sunshine, M., Saito, H., Georgopoulos, C. P. and Feiss, M.** (1978). Genetic analysis of two genes, *dnaJ* and *dnaK*, necessary for *Escherichia coli* and bacteriophage lambda DNA replication. *Mol Gen Genet* **164**, 9-14.
- Yoneda-Kato, N. and Kato, J. Y.** (2008). Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* **28**, 422-434.
- Yoneda-Kato, N., Look, A. T., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Raimondi, S. C., Cohen, K. J., Carroll, A. J. and Morris, S. W.** (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* **12**, 265-275.
- Yoneda-Kato, N., Tomoda, K., Umehara, M., Arata, Y. and Kato, J. Y.** (2005). Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *EMBO J* **24**, 1739-1749.
- Zaidman-Rémy, A., Regan, J. C., Brandão, A. S. and Jacinto, A.** (2012). The *Drosophila* larva as a tool to study gut-associated macrophages: PI3K regulates a discrete hemocyte population at the proventriculus. *Dev Comp Immunol* **36**, 638-647.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E. and Hermine, O.** (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* **193**, 247-254.
- Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Meyers, S., Rhoades, K. L., Larson, C. J., Chen, H. M., Hiebert, S. W. and Tenen, D. G.** (1996). CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* **16**, 1231-1240.
- Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A., Huang, G., Pardani, A., Menendez, S., Zhang, J., Dunne, R., Xiao, A., Erdjument-Bromage, H., et al.** (2008). Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* **22**, 640-653.
- Zhou, M. and Ouyang, W.** (2003). The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res* **28**, 25-37.